

ORSAY
Série A
n° d'ordre
706

Paris 1970

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Paul MATHIS

ETUDE DE FORMES TRANSITOIRES DES CAROTENOIDES

Soutenue le 19 octobre 1970, devant la Commission d'Examen

MM. M. MAGAT Président

L. SALEM

J. COURSAGET

J. JOUSSOT-DUBIEN Examineurs

L. LINDQUIST

P. FALLOT

ORSAY

Série A

n° d'ordre

706

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Paul MATHIS

ETUDE DE FORMES TRANSITOIRES DES CAROTENOIDES

Soutenue le 19 octobre 1970, devant la Commission d'Examen

MM. M. MAGAT

Président

L. SALEM

J. COURSAGET

J. JOUSSOT-DUBIEN

L. LINDQUIST

P. FALLOT

Examineurs

THÈSE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES PHYSIQUES

PAR M. MATHIEU

ETUDE DE FORMES TRANSCENDANTES DES CARACTÉRISTIQUES



Présentée à la Faculté des Sciences d'Orsay le 15 Mars 1967

Président

M. M. MATHIEU

M. L. L.

M. J. J.

M. K. K.

M. L. L.

M. P. P.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
GLOSSAIRE	
INTRODUCTION	1
A - LES CAROTENOIDES, PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES ET BIOLOGIQUES	2
A1. Rappels de structure	
A2. Propriétés spectroscopiques.	
A2.1. Spectres d'absorption	
A2.2. Luminescence des caroténoïdes	
A2.3. Autres expériences sur les états triplets.	
A2.4. Remarques.	
A3. Quelques aspects du rôle biologique des caroténoïdes	
A3.1. Généralités.	
A3.2. La Photosynthèse.	
A3.3. Rôles des caroténoïdes dans la photosynthèse.	
A4	
B - TECHNIQUES ET MATERIELS	13
B1. Spectroscopie d'éclairs.	
B1.1. Généralités.	
B1.2. Conditions requises.	
B1.3. Description des solutions adoptées.	
B1.3.1. Dispositif d'excitation	
B1.3.2. Cuves de mesure.	
B1.3.3. Dispositif d'analyse et de synchronisation.	
B1.3.4. Enregistrement et interprétation des résultats.	
B2. Pigments et matériel biologique	
B2.1. Caroténoïdes	
B2.2. Chlorophylle A	
B2.3. Purification du bleu de toluidine	
B2.4. Incorporation des pigments dans les micelles de digitonine	
B2.5. Matériel biologique	
C - ETAT TRIPLET DES CAROTENOIDES, TRANSFERT D'ENERGIE TRIPLET-TRIPLET DE LA CHLOROPHYLLE A AUX CAROTENOIDES	24
C1. Variations d'absorption de courte durée induite dans les chloroplastes par un éclair laser.	
C1.1. Observation de base	
C1.2. Spectre de différence	
C1.3. Influence des gaz paramagnétiques	
C1.4. Influence de l'intensité d'excitation	

- C1.5. Autres paramètres
 - C1.5.1. Intensité de lumière d'analyse
 - C1.5.2. Température
 - C1.5.3. Facteurs chimiques jouant un rôle dans la photosynthèse
- C1.6. Bilan sur l'état M observé dans les chloroplastes
- C2. Transfert d'énergie $\text{Chl } A_T \rightarrow {}^3\text{Car}$ en solution fluide
 - C2.1. Chlorophylle A seule
 - C2.2. Chlorophylle A + Caroténoïdes
 - C2.3. Discussion
- C3. Chlorophylle A et lutéine dans des micelles de digitonine.
 - C3.1. Digitonine. Micelles
 - C3.2. Description des variations d'absorption suivant l'excitation laser.
 - C3.2.1. Chlorophylle A seule
 - C3.2.2. Lutéine seule
 - C3.2.3. Chlorophylle A + Lutéine
 - C3.3. Discussion
- C4. Comparaison des résultats obtenus avec les chloroplastes, avec les pigments en solution et avec les pigments dans des micelles.
- C5. Etat triplet des caroténoïdes. Expériences diverses.
 - C5.1. Modification de la structure du chloroplaste
 - C5.2. Interprétation de la courbe $({}^3\text{Car}) = f(\text{énergie du laser})$ dans des chloroplastes.
 - C5.3. Vitesse du transfert $\text{Chl } A_T \rightarrow {}^3\text{Car}$ dans les chloroplastes et dans des micelles. Observation de $\text{Chl } A_T$ dans des structures photosynthétiques normales.
 - C5.4. Recherche d'autres propriétés de ${}^3\text{Car}$
- C6. Conclusion.
- D - PHOTOREACTIONS DU CAROTENE AVEC LE BLEU DE TOLUIDINE.
ETAT TRIPLET ET FORME OXYDEE DU CAROTENE

D1. Introduction

D2. Etude des propriétés spectroscopiques et photochimiques du bleu de toluidine en solution.

D2.1. Données chimiques et physico-chimiques

- a) Influence du pH. Formes de protonation
- b) Influence de la concentration. Dimérisation
- c) Propriétés oxydo-réductrices

D2.2. Propriétés photochimiques

- D2.2.1. Photoréduction en présence de réducteur
- D2.2.2. Photoréduction en l'absence de réducteur
- D2.2.3. Sensibilisation de photooxydations

D2.3. Comportement en spectroscopie d'éclairs

- D2.3.1. Etats triplets
- a) ${}^3\text{BH}_2^{++}$
 - b) ${}^3\text{BH}^+$
 - c) Autres propriétés des états triplets : niveau d'énergie, propriétés acido-basiques

D2.3.2. Réactions d'oxydo-réduction des états triplets des colorants thiaziniques

- a) Réactions avec des réducteurs
- b) Réaction de ${}^3\text{BH}^+$ avec l'oxygène
- c) Réaction avec le colorant à l'état fondamental

D2.4. Résumé des propriétés du bleu de toluidine

D3. Etude des réactions du BT excité avec le carotène.

D3.1. Influence du carotène sur la photoréduction du BT

D3.2. BT et carotène dans l'éthanol : variations de densité optique

- D3.2.1. Variations de densité optique entre 490 et 550 nm
- D3.2.2. Variations de densité optique entre 700 et 1000 nm
- D3.2.3. Variations de densité optique entre 340 et 490 nm
- D3.2.4. Variations de densité optique à 603 nm
- D3.2.5. Bilan

D3.3. Influence de différents facteurs

- D3.3.1. Température
- D3.3.2. Concentration en réducteur
- D3.3.3. Influence du pH

D4. Interprétation et discussion.

D4.1. Problèmes posés

D4.2. Hypothèses non retenues, sur la nature ou le mode de formation de X

D4.3. Explication proposée : $\text{X} = \text{Car}^+$

- D4.3.1. Hypothèse formulée
- D4.3.2. Schéma réactionnel
- D4.3.3. Confrontation du schéma réactionnel avec les résultats expérimentaux.

D4.4. Discussion

- D4.4.1. Mécanismes de disparition de Car^+
- D4.4.2. Transfert d'énergie et transfert de charge

E - DISCUSSION ET CONCLUSION

90

E1. Etat triplet des caroténoïdes

E1.1. Rappel des propriétés

E1.2. Discussion des propriétés spectroscopiques

E1.2.1. Niveau d'énergie

- a) Arguments tirés de la luminescence et des propriétés de conduction

b) Arguments tirés du transfert d'énergie	
c) Arguments tirés de la réaction avec l'oxygène	
d) Arguments tirés de la comparaison avec d'autres polyènes	
E1.2.2. Désexcitation des caroténoïdes	
E1.3. Conséquences biologiques	
E1.3.1. Les effets photodynamiques	
E1.3.2. Protection exercée par le carotène, par désexcitation de $^1\text{O}_2$	
E1.3.3. Protection exercée par le carotène, par transfert d'énergie $^3\text{S} \rightarrow ^3\text{Car}$	
E2. Cation radical Car^+	
E2.1. Rappel des propriétés	
E2.2. Propriétés spectroscopiques	
E2.2.1. Interprétations	
E2.2.2. Comparaison avec d'autres propriétés des polyènes	
E2.2.3. Comparaison avec les monocations des hydrocarbures alternants	
E2.2.4. Bilan	
E2.3. Conséquences biologiques	
E2.3.1. Equilibre redox des xanthophylles	
E2.3.2. Transfert d'électron du carotène à la ferrédoxine	
E2.3.3. Oxydation irréversible des caroténoïdes.	
E3. Conclusion.	
Annexe 1 - Montage des photomultiplicateurs. Observation des signaux	107
1 - Choix du tube photomultiplicateur	
2 - Réalisation	
3 - Observation des signaux	
Annexe 2 - Influence de la lutéine sur les agrégats ou les dimères de chlorophylle	111
Bibliographie	115

GLOSSAIRE

BT	bleu de toluidine
Car	béta-carotène ou caroténoïde
³ Car	état triplet du béta-carotène ou d'un caroténoïde
Chl A	chlorophylle A
Chl A _T	état triplet de la Chl A
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1, 1-diméthylurée
DO	densité optique
ΔDO	variation de densité optique
k _{diff}	constante de vitesse d'une réaction contrôlée par la diffusion. Nous avons pris $k_{diff} = \frac{8RT}{3000 \eta}$, avec R = constante des gaz ; T = température absolue et η = viscosité en poises. $R = 8,31 \cdot 10^7 \text{ erg (g mole deg)}^{-1}$
Lut	lutéine
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PM	photomultiplicateur
R _c	résistance de charge
t _{1/2}	demi-vie, temps au bout duquel un signal a diminué de moitié
ε	coefficient d'extinction molaire ; ce coefficient sera toujours exprimé en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, unité qui ne sera pas rappelée dans le texte
Δε	variation du coefficient d'extinction molaire entre deux formes d'une même molécule
λ	longueur d'onde (généralement exprimée en nm)
Δλ	bande passante d'un monochromateur
τ	durée de vie, temps au bout duquel une propriété décroissant exponentiellement a diminué d'un facteur e.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ETUDE DE FORMES TRANSITOIRES DES CAROTENOIDES

INTRODUCTION

Les caroténoïdes constituent un ensemble de substances dont les propriétés demeurent encore mal connues malgré l'intérêt qu'ils ont suscité et l'importance des travaux théoriques et expérimentaux dont ils ont fait l'objet. On ignore en effet ce que devient l'énergie absorbée par ces molécules puisque ni leur fluorescence, ni leur état triplet, ni aucune réaction photochimique n'ont été observés d'une façon certaine par excitation directe. D'autre part, on se pose toujours la question de savoir quel est le rôle biologique de ces composés universellement répandus dans le monde vivant. On en est réduit à de simples conjectures, faute d'arguments biologiques précis, faute aussi de bases physico-chimiques solides.

La très courte durée de vie de l'état singulet excité ainsi que le très faible peuplement (s'il existe) de l'état triplet des caroténoïdes ne confèrent à ces pigments qu'une bien faible aptitude à la photochimie. Néanmoins, nous avons pensé que les propriétés spectroscopiques pouvaient constituer une voie d'abord intéressante pour élucider certains rôles biologiques de ces pigments, ainsi qu'il en a été pour la vitamine A. Par ailleurs, nous avons pensé que des états métastables, intermédiaires dans certaines réactions photochimiques, pouvaient être impliqués dans le fonctionnement biologique des caroténoïdes ; ce sont ces états que nous avons recherchés par la méthode de spectroscopie par éclairs dont les progrès récents ont rendu possible cette étude.

Après de brefs rappels sur la chimie des caroténoïdes, leurs propriétés spectroscopiques et leurs rôles biologiques supposés, après une description des techniques utilisées - et en particulier de la technique de spectroscopie par éclairs - nous exposerons chronologiquement notre travail. Il concerne en premier lieu un état considéré comme l'état triplet de divers caroténoïdes, en second lieu une forme oxydée, réversible, du bêta-carotène. Les conséquences spectroscopiques et biologiques des résultats obtenus seront ensuite dégagées.

Au moment où nous avons entrepris ce travail on ne disposait, à notre connaissance, d'aucune donnée théorique ou expérimentale certaine sur les états métastables des caroténoïdes. Nous n'avons pas recherché ou étudié ceux-ci d'une façon systématique mais nous l'avons fait dans l'espoir de fournir quelques bases spectroscopiques au problème des rôles biologiques des caroténoïdes, et tout particulièrement à celui de leurs rôles dans la photo-

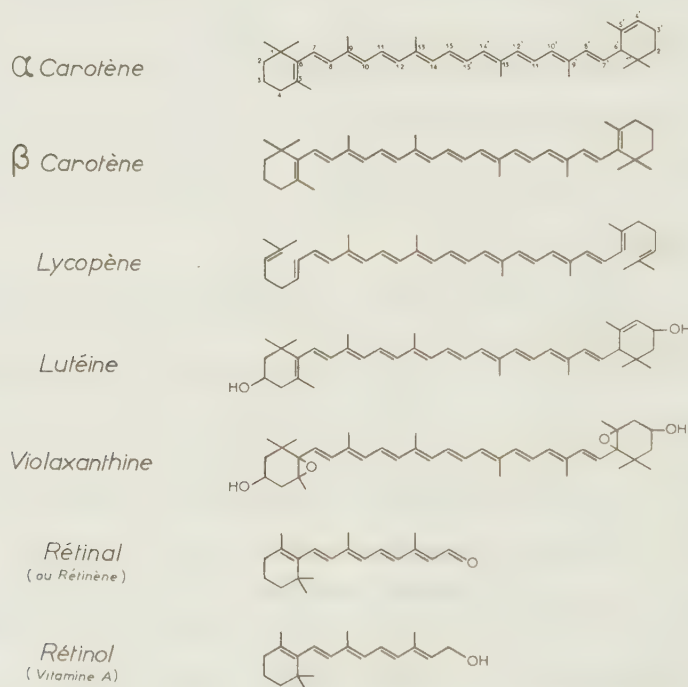
synthèse. Nous nous étions en effet initialement proposé d'étudier quelques réactions photo-chimiques primaires des structures photosynthétiques, au sein desquelles les caroténoïdes sont étroitement associés aux chlorophylles. C'est par un développement progressif qu'ayant mis en évidence un état transitoire dans des chloroplastes, nous avons été amené à en rendre compte en termes physico-chimiques dans des systèmes modèles et à étudier ainsi l'état triplet des caroténoïdes.

Dans le même esprit, nous avons étudié la forme oxydée des caroténoïdes, radical cation produit par transfert d'un électron à une molécule de bleu de toluidine portée à l'état triplet. Ce cation présente de l'intérêt pour rendre compte du rôle éventuel des caroténoïdes dans les transferts d'électrons, en biologie.

A - LES CAROTENOIDES, PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES ET BIOLOGIQUES

A-1 Rappels de structure

Les caroténoïdes sont des polyènes ; la plupart d'entre eux comportent un squelette de 40 atomes de carbone, squelette comportant lui-même une partie centrale en C_{18} : 7 doubles liaisons conjuguées et 4 groupes méthyle. De part et d'autre de cette partie centrale sont attachés deux groupes terminaux qui peuvent être identiques (bêta-carotène, lycopène, violaxanthine, ...) ou différents (alpha-carotène, lutéine, ...)(figure 1). Ces groupes terminaux peuvent être purement hydrocarbonés (bêta-carotène, lycopène) ou comporter des atomes d'oxygène appartenant à divers groupements ; hydroxyles (lutéine, zéaxanthine), époxy (violaxanthine) : cétone (canthaxanthine). Le nombre total de doubles liaisons conjuguées varie de 7 à 15, mais il est de 11 pour la plupart des caroténoïdes biologiquement importants.

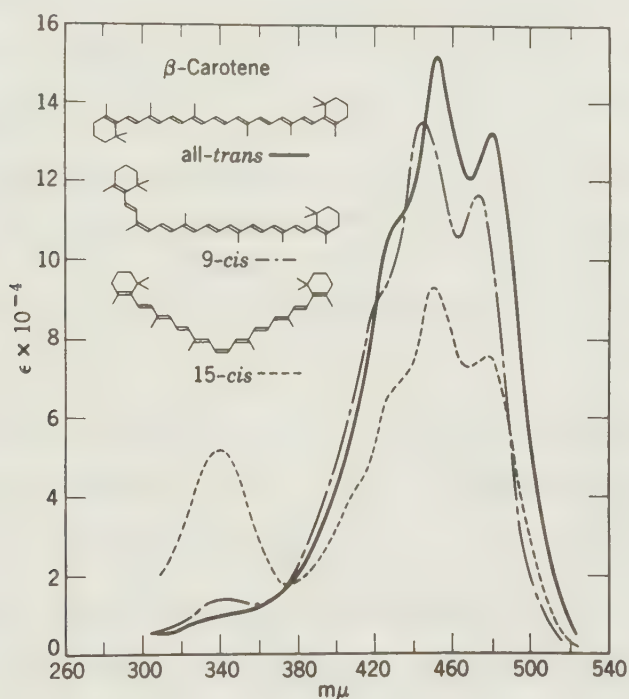


- Figure 1 -

Formules de quelques caroténoïdes naturels importants et de polyènes de la vision

Un bon nombre de caroténoïdes ont pu être synthétisés totalement, et de toute manière leur structure est actuellement connue en détail depuis les travaux des écoles de KARRER [87] et de ZECHMEISTER [189]. Il s'agit d'une structure relativement simple en dépit de la grande diversité de ces pigments : on compte plus de 80 caroténoïdes naturels. Chaque caroténoïde présente un grand nombre d'isomères géométriques possibles, tous plans; la forme ordinaire, généralement toute trans, peut être convertie en un mélange d'isomères cis-trans en quasi-équilibre par divers traitements : chauffage, éclairage, catalyse par l'iode, etc... Parmi les très nombreux stéréoisomères possibles seulement un petit nombre a pu être effectivement observé. Dans le cas particulier du bêta-carotène entièrement trans, le chauffage produit essentiellement deux isomères cis : 9-monocis et 9-15 dicis (figure 2).

Les caroténoïdes naturels sont classés en carotènes, qui sont de purs hydrocarbures, et xanthophylles qui comportent un ou plusieurs atomes d'oxygène. Les xanthophylles sont deux à trois plus abondants que les carotènes, dans les plantes vertes.



- Figure 2 -

Spectres d'absorption de quelques isomères du bêta-carotène, dans l'hexane (d'après JAFFE et ORCHIN, p. 233 [83])

A-2 Propriétés spectroscopiques des caroténoïdes

A-2-1 Spectres d'absorption

Les spectres d'absorption sont caractérisés par une bande de grande longueur d'onde, très intense ($\epsilon \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), dont la longueur d'onde du maximum augmente avec le nombre de doubles liaisons, et qui présente une structure vibrationnelle bien visible, surtout à basse température. Les spectres d'absorption sont souvent utilisés pour caractériser les caroténoïdes [36] [63] ; ils sont connus en détail et varient assez fortement avec le solvant.

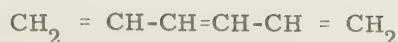
Pour la carotène * le maximum d'absorption varie de 451 nm dans l'hexane à 485 nm dans le sulfure de carbone. Les isomères comportant des doubles liaisons cis ont un spectre d'absorption peu différent de l'isomère entièrement trans (figure 2) : la bande visible est déplacée vers les courtes longueurs d'onde, et une nouvelle bande apparaît vers 340 nm (la bande "cis"). La structure vibrationnelle disparaît chez les isomères gênés stériquement. Il est toutefois remarquable que cette dernière propriété disparaisse à basse température où les empêchements stériques sont levés [172].

Une interprétation théorique simple des spectres d'absorption des polyènes a été faite par la méthode de l'électron libre (KUHN [104] PLATT [139 - 140]). Dans la formulation la plus simple de cette méthode on considère que l'électron délocalisé (électron π) est libre dans un puits de potentiel carré : potentiel nul le long de la chaîne, potentiel infini aux extrémités. En raffinant légèrement, par l'introduction d'une périodicité du potentiel le long de la chaîne, il est possible de rendre compte des principales caractéristiques des spectres d'absorption des polyènes : augmentation de la longueur d'onde du maximum d'absorption avec la longueur de la chaîne avec une limite finie pour les chaînes très longues, intensités relatives des bandes, effet des substituants, ect... La bande cis correspond à une transition entre deux états de même parité. Elle est donc interdite pour les isomères trans qui possèdent un centre de symétrie, mais devient permise quand la symétrie de la molécule est détruite (isomères cis) (JAFFE et ORCHIN [83]). Les théories modernes les plus raffinées ont été discutées dans la thèse de C. TRIC [166] ; dans ces théories on considère le polyène comme une succession de fragments éthyléniques en interaction, ou bien les orbitales de la molécule dans son ensemble.

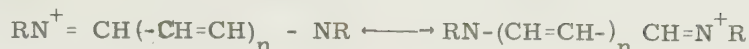
Il peut être intéressant de remarquer la différence qui existe entre les polyènes symétriques et les polyméthines symétriques (JAFFE et ORCHIN [83]). Pour ces derniers, on peut écrire deux structures équivalentes dans l'état fondamental, ce qui a pour conséquence que toutes les liaisons carbone-carbone sont équivalentes et ont même longueur. Cela n'est pas vrai pour les polyènes où il y a alternance de simples et de doubles liaisons. Pour le carotène (11 doubles liaisons) le calcul effectué par KUHN [104] donne une longueur d'onde d'absorption maximale ($\lambda_{\max}$) à 451 nm, très proche de la valeur expérimentale ; par contre si le carotène est considéré comme un polyméthine, on obtient $\lambda_{\max} = 1100$ nm. Il est intéressant de constater qu'un complexe carotène-iode présente une bande d'absorption très intense ($\epsilon \sim 2.10^5$) à 1000 nm [117]. Ce complexe a été interprété par EBREY [44] comme présentant un certain nombre de structures résonantes qui l'apparentent à un polyméthine :

* Pour simplifier l'écriture le bêta-carotène sera appelé carotène par la suite.

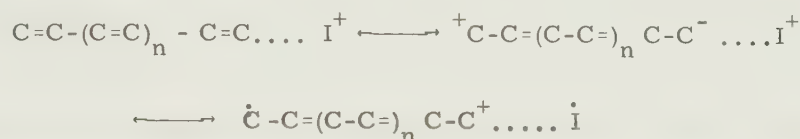
Polyène :



Polyméthine (ex : cyanine) :



Complexe polyène-iode (quelques structures importantes) :



A-2-2 Luminescences des caroténoïdes.

La fluorescence de certains polyènes substitués a été étudiée d'une façon systématique, en particulier par les groupes de KUHN [71] et de NIKITIN [134]. Par contre les données expérimentales sur les états excités des caroténoïdes sont négatives ou contradictoires.

En 1944, LEWIS et KASHA ont observé une luminescence du lycopène, avec un maximum vers 546 nm [107]. Cette émission est absente avec l'isomère entièrement trans, mais elle apparaît après chauffage de l'échantillon, ce qui a pour effet, entre autres, de produire des isomères cis. La luminescence étant considérée comme une phosphorescence, on a développé l'idée que les isomères trans des caroténoïdes n'étaient pas phosphorescents, alors que les isomères cis l'étaient. Il n'y a toutefois pas eu de confirmation précise de cette idée.

En 1963, LYALIN et coll [118] ont mis en évidence une fluorescence du carotène et de la lutéine, à l'état cristallisé, dans un verre à 77 °K, ou encore lorsque ces pigments sont adsorbés sur du verre microporeux. Cette fluorescence présente un pic vers 550 nm et s'étend assez loin vers le rouge. Le temps de vie de cet état excité, pour du carotène adsorbé sur du verre, serait de $12 \cdot 10^{-9}$ s. Ce dernier résultat jette un doute sur l'origine de l'émission ; en effet le temps de vie "naturel", calculé à partir du spectre d'absorption, est de 2 ns pour le carotène (TRIC [166]). Il est donc très possible que l'émission provienne d'une impureté.

WOLF et STEVENS [184] n'ont pas observé de fluorescence visible pour quatre caroténoïdes (carotène, lutéine, isolutéine, violaxanthine), mais ils ont observé une émission vers 340 nm en excitant à 280 nm. Dans un travail récent, CHERRY et coll. [24] ont montré que cette émission à 340 nm était probablement une raie de diffusion Raman ; par contre ils ont mis en évidence deux types d'émission du carotène (isomères entièrement trans et 15-15' cis) : une émission de courte durée de vie, présentant un maximum vers 550 nm, et une émission de très longue durée de vie (4s) qui n'a lieu qu'à basse température (moins de 107 °K) et en l'absence d'oxygène. Les isomères trans et 15-15' cis présentent des émissions très semblables. La luminescence de courte durée, considérée comme une fluorescence,

est probablement celle qu'observent TRIC et LEJEUNE [167], d'autant plus que le carotène provient de la même origine ; elle est donc justiciable de la critique qu'en font ces auteurs qui donnent de bonnes raisons de penser qu'elle provient d'une impureté. Quant à l'émission de très longue durée elle est considérée comme une phosphorescence ; elle indiquerait une valeur de $17\,000\text{ cm}^{-1}$ (588 nm) pour la transition $T \leftarrow S_0$ (O-O). Ce point sera discuté en détail plus loin.

A-2-3 Autres expériences sur les états triplets

La spectroscopie par éclairs n'a pas apporté de renseignements sur les états triplets des caroténoïdes. Les essais d'excitation directe se sont révélés vains [111]. En ce qui concerne des polyènes plus courts, des expériences de spectroscopie par éclairs ont mis en évidence l'état triplet du rétinol [3] [65], qui présente un pic d'absorption vers 450 nm, et dont le temps de vie varierait de 10 μs (hexane, 25 °C) à 140 μs (glycérol, - 75 °C). Par contre, le rétinol (vitamine A) ne présente aucune absorption transitoire par excitation directe ; son état triplet peut être peuplé par transfert. Inversement le rétinol est fluorescent alors que le rétinol ne l'est pas. Une interprétation en a été donnée en termes d'états $\pi\pi^*$ et $n\pi^*$ ce dernier n'étant présent que chez le rétinol.

Des expériences de photoconductivité ont permis de faire des suppositions sur les états excités des caroténoïdes, l'idée de base étant que l'état triplet constitue une étape intermédiaire dans la création de charges mobiles donnant lieu à la photoconductivité des molécules organiques (ROSENBERG [149]). Ce dernier auteur a mesuré les énergies d'activation du courant de semi-conduction de divers isomères du carotène, ainsi que les énergies d'activation et les spectres d'excitation de la photoconduction [150]. Il en conclut que le plus bas niveau triplet est situé vers 3,0 eV (soit 420 nm), c'est à dire à une énergie supérieure à celle du premier état singulet excité (485 nm). Cette position relative des niveaux expliquerait le fait qu'on n'a jamais vu l'état triplet des caroténoïdes par excitation directe. Toutefois les interprétations sont très spéculatives et les résultats expérimentaux sont sujet à contestation car le travail a été effectué sur des poudres microcristallines ou des verres assez mal définis. En particulier CHAPMAN et coll. [20] [21], critiquant les techniques de ROSENBERG, ont étudié la photoconductivité de monocristaux de caroténoïdes. La principale conclusion de leur étude est que tous ces cristaux présentent, dans le spectre d'excitation de leur photoconductivité, une bande située vers $13\,000\text{ cm}^{-1}$ (770 nm), tandis que l'excitation de la bande d'absorption principale est moins efficace. Comment interpréter ce spectre alors que le coefficient d'extinction molaire est très faible dans cette région ($< 0,3$) ? CHERRY et CHAPMAN [23] font trois hypothèses :

- production de porteurs libres suivant l'excitation à un état triplet.
- production de porteurs libres suivant l'excitation à un état de transfert de charge.
- excitation directe dans une bande de conduction.

Toutefois l'hypothèse de l'état triplet leur semble la plus probable.

D'autres catégories d'expériences ont donné des indications sur les états triplets des caroténoïdes : il s'agit des expériences de desexcitation ("quenching") d'états triplets. LIVINGSTON et FUJIMORI [111] ont montré que le carotène désactive l'état triplet de la chlorophylle. La constante de vitesse de la réaction est un peu inférieure à celle qu'on attendrait d'une réaction limitée par la diffusion ($1,3 \cdot 10^9$ au lieu de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dans le benzène à la température ordinaire). Par ailleurs la photooxydation de la chlorophylle A en solution se fait très probablement à partir de l'état triplet, et les travaux de CLAES ont établi que les caroténoïdes protégeaient la chlorophylle A contre la photooxydation. Toutefois avec des analogues du carotène à nombre plus faible de doubles liaisons (comme le dzéta-carotène, 7 doubles liaisons) il n'y a pas de protection (CLAES [26]). Une interprétation possible de ces résultats consiste à admettre que les caroténoïdes possèdent un état triplet d'énergie inférieure à l'état triplet de la chlorophylle A; celui-ci est supposé être à environ $10\,000 \text{ cm}^{-1}$ ($1\,000 \text{ nm}$) au-dessus de l'état fondamental (PARKER et JOYCE [137]). Par ailleurs il a été montré récemment que le carotène désactivait l'oxygène singulet dans l'état $^1\Delta_g$ [54]. Les auteurs attribuent cet effet à la réaction :

$^1_0_2 + \text{carotène} \rightarrow ^3_0_2 + ^3\text{carotène}$. Comme l'énergie de 1_0_2 est de $22 \text{ kcal.mole}^{-1}$, cela placerait l'énergie du carotène triplet au voisinage ou au-dessous de cette valeur ($22 \text{ kcal.mole}^{-1} \longleftrightarrow 1200 \text{ nm}$).

A-2-4

En résumé de ce tour d'horizon sur les propriétés spectroscopiques des caroténoïdes on peut dégager deux idées principales. La première c'est que les spectres d'absorption et les niveaux singulets sont aisément expliqués par les théories actuelles. La seconde est qu'il existe, à partir du premier état singulet excité, des mécanisme de désexcitation très rapides et mal connus. On peut invoquer la flexibilité de la molécule, avec la possibilité de nombreux croisements avec des niveaux vibrationnels de l'état fondamental. En particulier l'extrapolation de résultats théoriques obtenus sur l'éthylène est très suggestive : existence d'un niveau de plus faible énergie que le premier état singulet excité, où il y a rotation de 90° autour de la double liaison. Dans les caroténoïdes il y a beaucoup de doubles liaisons essentielles (liaisons doubles dans toutes les formules de résonance les plus importantes), et donc beaucoup de niveaux possibles en-dessous du plus bas niveau singulet excité S_1 . On trouve là une des explications des photoisomérisations des caroténoïdes (MAC GLYNN [120]).

L'expérimentateur est dérouté par le faible rendement des observables (fluorescence, phosphorescence, photoconductivité, etc...); ce qui l'expose à tous les artéfacts possibles ; c'est sans doute ce qui explique le caractère contradictoire des résultats obtenus. Même si l'on peut comprendre que la désexcitation vibrationnelle est très rapide chez les caroténoïdes, on comprend mal pourquoi elle aboutit beaucoup plus souvent à l'état fondamental qu'à l'état triplet. Une explication a toutefois été suggérée, c'est que l'énergie de l'état triplet est supérieure à celle de S_1 . Une telle inversion par rapport à la règle de HUND a été invoquée pour expliquer les propriétés de luminescence des azines (MAC GLYNN [120]). Cet auteur estime qu'il est possible qu'on ait le même effet avec les caroténoïdes, sur la base de la description des "molécules dans la molécule", c'est à dire à partir de l'interaction d'oscillateurs éthyléniques.

Une question n'a pas encore été abordée, c'est celle des propriétés photochimiques des caroténoïdes. Celles-ci sont très faibles : photoisomérisations et photooxydations. Ces deux réactions sont en fait beaucoup plus efficaces en présence de corps comme l'iode ou la chlorophylle A qui jouent peut-être le rôle de photosensibilisateurs [189]. La faible réactivité photochimique des caroténoïdes, qui est tout à fait compréhensible si l'énergie qu'ils absorbent est dégradée très rapidement en vibrations, va nous laisser dans l'incertitude pour aborder la deuxième partie de ce chapitre. Comment des molécules aussi peu réactives photochimiquement vont-elles pouvoir jouer un rôle en photobiologie ?

A-3 - Quelques aspects du rôle biologique des caroténoïdes

A-3-1

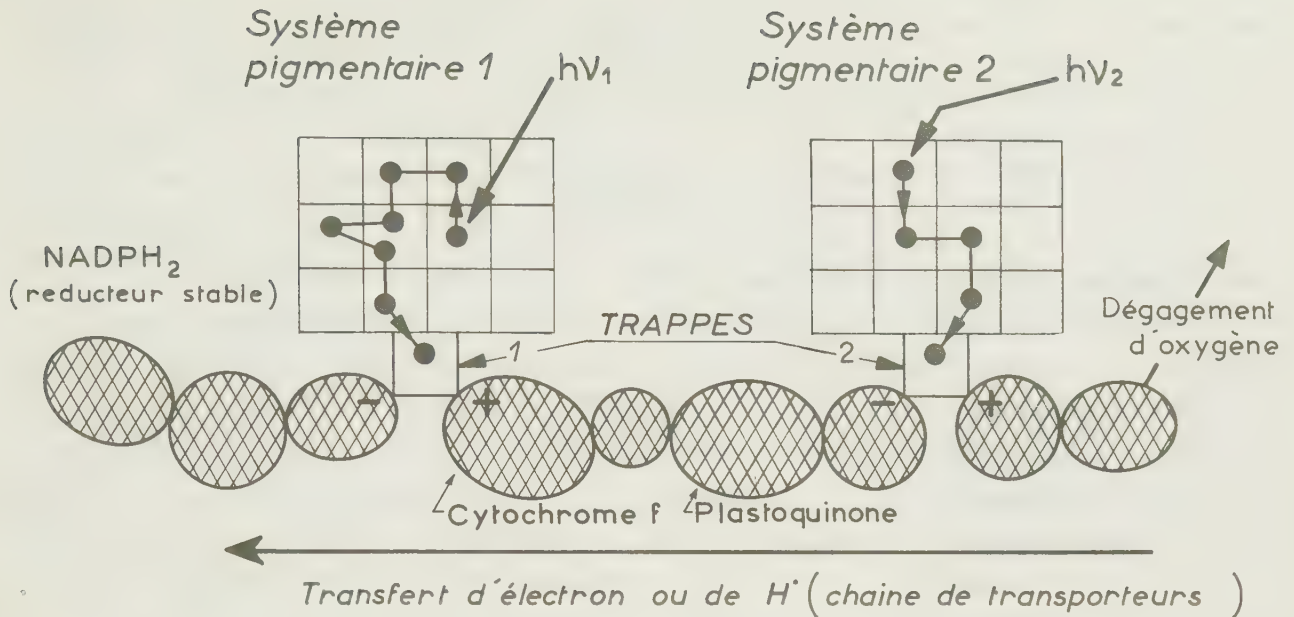
Les caroténoïdes sont universellement répandus dans le règne végétal et chez de nombreuses bactéries. Leur rôle est mal connu et de nombreux biologistes sont à la recherche d'un rôle universel qui "justifierait" l'abondance naturelle des caroténoïdes. Ils sont invoqués, sur des bases souvent très faibles, dans les phénomènes de phototropisme (plantes supérieures, champignons), de phototactisme (particulièrement chez les Euglènes), et dans la protection des organismes (bactéries, champignons, algues) contre les oxydations photosensibilisées par les pigments naturels.

Toutefois, dans aucun de ces phénomènes, le rôle des caroténoïdes n'a pu être démontré de façon certaine (pour une revue, voir BURNETT [17] ou KRINSKY [103]). Nous nous intéresserons ici particulièrement à leur rôle dans la photosynthèse, phénomène qu'il nous semble auparavant nécessaire de situer brièvement.

A-3-2

On appelle photosynthèse l'ensemble des processus, qui, chez les végétaux chlorophylliens, transforment l'énergie électromagnétique de la lumière en énergie chimique, d'une façon quantitative. L'ensemble de ces processus est très complexe et il y a de grandes variations entre les plantes supérieures (qui absorbent du CO_2 et rejettent de l'oxygène), les algues, les bactéries (où les substrats sont très variés). Citons quelques caractéristiques générales, dans l'interprétation qui est la plus répandue actuellement (figure 3).

- a) la lumière est absorbée par une masse de pigments collecteurs, et l'énergie est ensuite transférée jusqu'à certains sites privilégiés (les pièges ou trappes) où se produit une ionisation. Il y a migration de charge et création d'un pôle positif, auquel serait lié le dégagement d'oxygène, et d'un pôle négatif capable de réduire le NADP. Celui-ci est l'agent réducteur du cycle de CALVIN, au cours duquel des sucres sont formés, suivant des réactions complexes équivalentes à une réduction du CO_2 . Il se forme en outre, d'une manière tout à fait inconnue, des molécules d'ATP (adénosine triphosphate) capables de céder de l'énergie libre pour certaines réactions du cycle de CALVIN.



- Figure 3 -

Schéma hypothétique simplifié d'une unité fonctionnelle photosynthétique. Ce schéma décrit certains aspects du fonctionnement du chloroplaste et ne correspond peut-être pas à la structure réelle du chloroplaste [30] [147].

-b) l'ensemble de ces réactions se déroulent au sein de structures lamellaires. L'unité fonctionnelle, pour la photosynthèse, est le chloroplaste, organe cellulaire de forme lenticulaire dont le diamètre est de quelques microns. C'est dans le chloroplaste que sont concentrés les pigments ; pour les plantes supérieures il s'agit de chlorophylles A et B ainsi que de caroténoïdes. Si la chlorophylle A était dispersée dans les lamelles sa concentration serait de l'ordre de 10^{-1} à $10^{-2}M$. En fait, le chloroplaste comprend lui-même une partie protéique de structure assez lâche (le stroma) et des lamelles lipo-protéiques, comprenant les pigments, dont la structure est très résistante. La complexité des lamelles rend leur étude très difficile et la disposition des pigments y est pratiquement inconnue. Le tableau page 9 donne un exemple de la composition chimique de lamelles chloroplastiques.

-c) les pigments photosynthétiques constituent un ensemble hétérogène. De nombreux auteurs les répartissent en "systèmes photochimiques", généralement deux, les deux systèmes fonctionnant en série pour le transfert d'électrons. Ces systèmes sont représentés schématiquement sur la figure 3. Toutefois ce schéma à deux systèmes ne rend pas compte de toutes les propriétés des chloroplastes : certains auteurs ont été conduits à imaginer un troisième système tandis que d'autres contestent le principe même du schéma.

Diverses expériences tendent à montrer une répartition hétérogène des caroténoïdes dans les chloroplastes [164] [169] [170]. En particulier, le fractionnement de ceux-ci par différentes méthodes (détergents, action des ultra-sons, ...) fournit généralement deux fractions : une fraction légère, correspondant au photosystème 1, est enrichie en chlorophylle A

(par rapport à la B) et en β -carotène (par rapport aux xanthophylles) ; inversement la fraction lourde correspondrait au photosystème 2. Elle est enrichie en chlorophylle B et en xanthophylles. L'hétérogénéité des caroténoïdes a également été montrée par des expériences d'extraction différentielle par des solvants organiques plus ou moins polaires [38].

- Tableau -

Nombre de molécules par atome de manganèse		Poids moléculaire correspondant
Chlorophylles	115	103 200
Chlorophylle A	80	
Chlorophylle B	35	
Caroténoïdes	24	13 700
Béta-carotène	7	
Lutéine	11	
Violaxanthine	3	
Néoxanthine	3	
Quinones	23	15 900
Lipides	327	362 200
Protéines (4690 atomes d'azote)		464 000

Composition des lamelles de chloroplastes d'épinards, sur la base d'un poids moléculaire de 960 000 par atome de manganèse (les quantités sont rapportées à l'atome de Mn dans l'hypothèse de l'existence d'unités structurales, ou quantasomes, dont chacune contiendrait un atome de Mn) d'après PARK et BIGGINS [136].

A-3-3

Comme les autres pigments photosynthétiques les caroténoïdes sont localisés dans les lamelles chloroplastiques. Quels rôles y jouent-ils ?

- a) le premier rôle qui leur a été reconnu est de transférer leur énergie d'excitation électronique (singulet) à la chlorophylle [42]. Ce transfert a été mis en évidence par la sensibilisation de la fluorescence de la chlorophylle et par le spectre d'action de la photosynthèse. Chez les algues brunes la fucoxanthine transfère son énergie à la chlorophylle A avec un rendement de 80 à 100 %. Chez les bactéries pourpres le rendement de transfert de caroténoïdes bactériens (spirilloxanthine et rhodopine) à la bactériochlorophylle est d'environ 40 %. Chez les algues vertes et les plantes supérieures, le rendement serait aussi de l'ordre de 40 %. Ce rôle des caroténoïdes de transférer leur énergie à la chlorophylle est maintenant bien établi et il est considéré comme une adaptation permettant aux végétaux d'utiliser plus efficacement la lumière qu'ils reçoivent. L'examen détaillé des résultats expérimentaux laisse quand même subsister quelques questions :

- Comment peut-on avoir un transfert efficace entre caroténoïdes et chlorophylles, alors que le rendement de fluorescence des caroténoïdes est trop faible pour avoir jamais été mesuré avec certitude, et que le recouvrement entre le spectre d'absorption de la chlorophylle et le spectre d'émission des caroténoïdes est très petit ? .

Il est nécessaire que la distance chlorophylle-caroténoïdes soit très petite in vivo. TEALE [162] a estimé la distance de demi-transfert à $8,6 \text{ \AA}$ et il a montré, pour des pigments inclus dans des micelles de détergent, un transfert d'énergie de différents caroténoïdes à la chlorophylle A, avec un rendement pouvant atteindre 100 % .

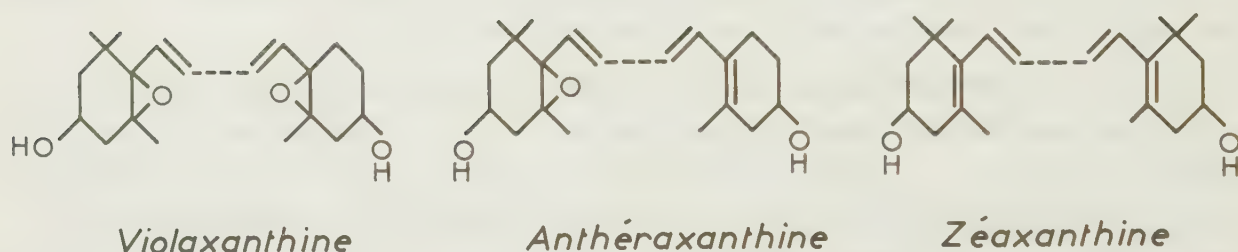
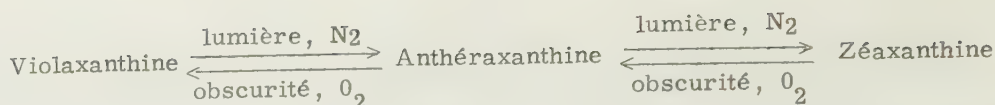
- Des résultats récents de GOODHEER [61] montrent que l'énergie absorbée par le carotène, dans différents types d'algues, est transférée à la chlorophylle A avec un rendement qui approche 100 % , tandis que pour les xanthophylles ce rendement serait très faible. Comme cette différence ne peut être attribuée à une différence de propriétés spectroscopiques et comme les expériences effectuées dans des détergents [162] montrent que l'énergie peut être transférée des xanthophylles à la chlorophylle A, il faut conclure à une disposition différente du β -carotène et des xanthophylles dans la structure du chloroplaste, en accord avec l'hétérogénéité signalée précédemment.

- b) un deuxième rôle a été attribué aux caroténoïdes : celui de protéger les organismes contre les photooxydations sensibilisées par la chlorophylle. Un vaste travail a été effectué sur de nombreux organismes pour prouver que des mutants dépourvus de caroténoïdes ne peuvent survivre en présence simultanément de lumière et d'oxygène ; il s'agit donc d'un effet photodynamique. Cet effet a été mis en évidence par GRIFFITHS et coll [66] sur des bactéries, en utilisant des mutants ou en bloquant la biosynthèse des caroténoïdes par la diphénylamine. Quand ces organismes sont éclairés en présence d'oxygène, on constate une léthalité importante et une destruction de la chlorophylle. Par ailleurs ces mutants photosensibles contiennent des caroténoïdes non colorés, comportant moins de 8 doubles liaisons (phytoène, phytofluène, δ -carotène) ; ces derniers ne peuvent donc pas jouer le même rôle de protection que les caroténoïdes à 11 doubles liaisons.

- c) d'autres rôles, beaucoup moins précis, ont été attribués aux caroténoïdes dans la photosynthèse.

En premier lieu il a été constaté que les chloroplastes de mutants dépourvus de caroténoïdes présentaient une structure défectueuse sur le plan de leur organisation en lamelles ou de l'empilement de celles-ci en granums [5] [48]. On ne peut pas dire grand chose actuellement sur les raisons de ces défauts ; peut-être est-il possible de les rapprocher des défauts résultant, dans les membranes animales, d'un manque ou d'un excès de vitamine A [39].

Par ailleurs on a voulu souvent leur faire jouer un rôle dans le transfert d'électrons photosynthétique, sur des bases théoriques [141] ou expérimentales. Parmi celles-ci il faut citer l'existence d'un équilibre d'oxydo-réduction des xanthophylles (figure 4) [187].



- Figure 4 -

Formules simplifiées de trois xanthophylles en équilibre d'oxydo-réduction "in vivo".

La signification de cette série d'équilibres est encore mal comprise ; certains auteurs pensent que les époxyxanthophylles participent au dégagement d'oxygène photosynthétique. Par ailleurs LUNDEGARDH [116] a interprété certains résultats en solution en terme de transfert d'électrons du carotène à la ferrédoxine et au NADP, deux transporteurs d'électrons photosynthétiques (la ferrédoxine serait située entre la trappe du système I et le NADP). KAHN et PURCELL [85] ont montré que la vitesse de production d'un réducteur stable ($NADPH_2$) par des chloroplastes était accélérée jusqu'à 350 % par l'addition de caroténoïdes extraits de chloroplastes. Récemment GIRAULT et coll [60], après avoir traité, à l'heptane, des chloroplastes lyophilisés (ce traitement extrait le carotène et les plastoquinones), ont récupéré une partie de leur activité photochimique (réduction du NADP, photophosphorylations) par addition de bêta-carotène. Toutes ces expériences sont fragmentaires et peuvent être expliquées par un rôle clef des caroténoïdes dans certaines structures, ou bien dans le transfert d'électrons directement, ou bien encore comme tampon rédox par l'intermédiaire de l'équilibre entre formes plus ou moins oxydées.

Enfin les caroténoïdes restent des candidats sérieux pour l'interprétation des "effets de lumière bleue" [57] [97] [151]. Il s'agit là d'effets liés à la photosynthèse et où la lumière bleue a une action particulière : prise d'oxygène par les chloroplastes, stimulation de la respiration, orientation en faveur des acides aminés des premières étapes du métabolisme du CO_2 incorporé. Ces effets sont encore mal compris et les pigments responsables pourraient être des caroténoïdes ou des flavines.

A-4

On voit que beaucoup d'inconnues subsistent dans le problème des rôles biologiques des caroténoïdes. Un travail sur les états excités de ces molécules est susceptible d'apporter quelques éclaircissements. Le travail que nous avons entrepris, basé essentiellement sur la spectroscopie par éclairs à résolution rapide, nous a amené, suivant une chronologie qui est à peu près respectée dans l'exposé qui va suivre, à préciser quelques propriétés des états métastables des caroténoïdes, dans le chloroplaste ou dans des systèmes physico-chimiques mieux définis.

B - TECHNIQUES ET MATERIELS

Dans ce chapitre nous décrivons la technique de spectroscopie par éclairs et la préparation des diverses substances étudiées. Les techniques particulières seront décrites en même temps que les expériences.

B-1 Spectroscopie par éclairs

B-1-1 Généralités

La technique des éclairs a acquis depuis longtemps droit de cité dans le domaine de la photosynthèse. WARBURG [174] en 1919, utilisait déjà une lumière intermittente dont la période descendait jusque 10^{-3} s. En 1932 EMERSON et ARNOLD [45] utilisaient des éclairs de 10^{-5} s pour obtenir leurs résultats fondamentaux sur les réactions lumineuses et les réactions obscures. Les auteurs précédents excitaient la photosynthèse avec des éclairs et analysaient les effets par des méthodes chimiques, en particulier la manométrie de WARBURG.

De gros progrès ont été rendus possibles avec le développement de méthodes spectroscopiques pour l'étude des effets des éclairs. La technique de photolyse-éclair, développée initialement par NORRISH et PORTER [135], a été appliquée à l'étude des pigments photosynthétiques en solution [29] [109] [114]. La majeure partie des études ultérieures a été effectuée par la méthode photométrique développée initialement par DAVIDSON [35]. Dès 1954, WITT utilisait la technique de spectroscopie par éclairs (ou spectrophotométrie d'absorption par excitation-éclair) à l'étude de réactions photoinduites dans des suspensions de chlorelles (algues vertes) [181] [183]. Par la suite l'équipe de WITT a donné une extension considérable à ces travaux [182], tandis que de nombreux autres auteurs étudiaient par la même méthode des aspects particuliers des réactions primaires photosynthétiques [19] [91] [95].

La technique de spectroscopie par éclairs est maintenant bien connue (on peut se reporter par exemple à la revue que fait LIVINGSTON [110]). On peut la schématiser simplement en considérant une cuve spectrophotométrique contenant un certain nombre de substances chimiques. Soit c_i la concentration, en mole.litre⁻¹ ou M, de la substance de type i, et soit $\epsilon_{i\lambda}$ son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ . Une lumière d'analyse monochromatique et parallèle, d'intensité I_0 , tombe sur la cuve de longueur l (cm), et en ressort avec une intensité I. On a la relation :

$$\text{densité optique (DO)} = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \sum_i \epsilon_{i\lambda} c_i l$$

Si on perturbe rapidement l'équilibre, par exemple par un éclair de lumière absorbée par le système, les concentrations deviennent $c_i(t)$ et I devient $I(t)$. On a un changement de DO dont l'amplitude, la cinétique et la variation avec la longueur d'onde d'analyse donnent des indications sur les réactions produites par la perturbation (éclair excitateur). La théorie de la méthode est toujours simple, mais l'étude expérimentale de systèmes complexes fournit souvent des résultats difficiles à interpréter, à cause de la multiplicité des réactions possibles et de la mauvaise connaissance que l'on a de l'état initial du système.

Dans le cas où une seule concentration c varie, on a simplement :

$$DO + \Delta DO = \epsilon_{\lambda} l (c + \Delta c) = \log_{10} \frac{I_0}{I + \Delta I}$$

d'où
$$\Delta DO = \epsilon_{\lambda} l \cdot \Delta c = \log_{10} \left(1 - \frac{I}{I + \Delta I} \right)$$

Dans la plupart des cas qui nous concerneront $\frac{\Delta I}{I}$ sera très faible (inférieur à 10 %). On a alors approximativement :

$$\Delta DO = \frac{-1}{2,3} \cdot \frac{\Delta I}{I}$$

B-1-2 Conditions requises

Le dispositif de spectroscopie par éclairs que nous avons réalisé était soumis à un certain nombre d'impératifs liés à la nature du matériel étudié et aux types de réactions recherchées : l'objectif initial étant d'aborder des réactions primaires de la photosynthèse, cela imposait d'étudier des réactions rapides sur un matériel biologique (essentiellement des chloroplastes).

a) la première caractéristique des systèmes étudiés est leur complexité sur le plan physico-chimique. Le chloroplaste comprend de nombreux constituants et de nombreux pigments, et il est difficile d'en isoler des structures qui soient fonctionnelles et simples. Par ailleurs l'existence de structures conduit à des cinétiques différentes de celles qu'on observe en milieu liquide ou en milieu solide homogène : certaines réactions sont favorisées, d'autres interdites.

b) une autre caractéristique des milieux étudiés (chloroplastes ou pigments en solution) est leur photosensibilité. La chlorophylle est un photosensibilisateur très efficace, et in vivo un photon absorbé pour 200 molécules de chlorophylle suffit à saturer l'appareil photosynthétique pendant un temps de l'ordre de 10^{-2} s. En solution les risques sont multiples : photo-oxydation de la chlorophylle, photoréduction du bleu de toluidine, isomérisation du carotène. Il sera donc important de minimiser les durées et les intensités des éclaircissements de mesure.

c) les structures photosynthétiques se mettent en suspension dans de l'eau contenant ou non différents composés : tampon pH, tampon osmotique, inhibiteurs, etc... Ces suspensions diffusent la lumière et, en dépit de certaines améliorations apportées par l'addition de glycérol ou d'albumine qui égalisent l'indice de réfraction du solvant avec celui des protéines de structure, cette diffusion perturbe les spectres d'absorption. Cette perturbation consiste essentiellement en un aplatissement des spectres ; on peut la minimiser en collectant une part aussi importante que possible de la lumière analytique diffusée, ce qui peut se faire en plaçant le récepteur de lumière près de l'échantillon, de façon à couvrir un angle solide important.

d) l'étude des réactions photochimiques des structures photosynthétiques est rendue difficile par la faible quantité des intermédiaires présents. Cela est une conséquence de l'existence, au moins statistique, d'unités photosynthétiques : on trouve une molécule d'intermédiaire (trappe, transporteur d'électrons...) pour 100 à 1000 molécules de chlorophylle (figure 3).

Si l'on travaille, en spectroscopie d'absorption différentielle, avec des solutions de DO de l'ordre de 1, on aura donc des variations de l'ordre de 10^{-3} DO, dont l'étude nécessite une résolution voisine de 10^{-4} DO. Ce petit nombre de molécules actives, comparativement aux pigments collecteurs d'énergie, constitue une différence essentielle par rapport aux milieux étudiés habituellement en photolyse-éclair, où il n'est pas rare qu'on puisse dépeupler presque totalement l'état fondamental des molécules étudiées.

e) la nécessité d'étudier des intermédiaires de courte durée de vie a des conséquences importantes sur le plan de la technique. L'objectif initialement fixé était un temps de résolution de 10^{-8} s. Il fallait donc un éclair excitateur très court mais quand même suffisamment intense, et un dispositif d'analyse rapide. Ce dernier point appelle quelques précisions. En effet la limitation essentielle, dans la mesure de faibles Δ DO, tient au bruit d'émission quantique du photorécepteur. Si celui-ci est un photomultiplicateur, il s'agit des fluctuations ΔI_{ph} du courant de photocathode I_{ph} . On a la relation :

$$\Delta I_{ph} = \frac{1}{(d I_{ph})^2}^{1/2}$$

où $d I_{ph}$ est la variation du courant par rapport à sa valeur moyenne, pendant l'intervalle de temps considéré. Si F est la bande passante (en hertz) du dispositif d'analyse, et e la charge de l'électron, on a la relation :

$$\frac{\Delta I_{ph}}{I_{ph}} = \left(\frac{2 e F}{I_{ph}} \right)^{1/2}$$

F est imposé par la rapidité des phénomènes ($F = 3.10^7$ Hz dans notre objectif). Quand au rapport $\frac{\Delta I_{ph}}{I_{ph}}$ il doit être inférieur à la plus petite variation $\frac{\Delta I}{I}$ du niveau lumineux

que l'on veut mesurer, soit $\frac{\Delta I_{ph}}{I_{ph}} < 2,3. \Delta DO_{min.}$

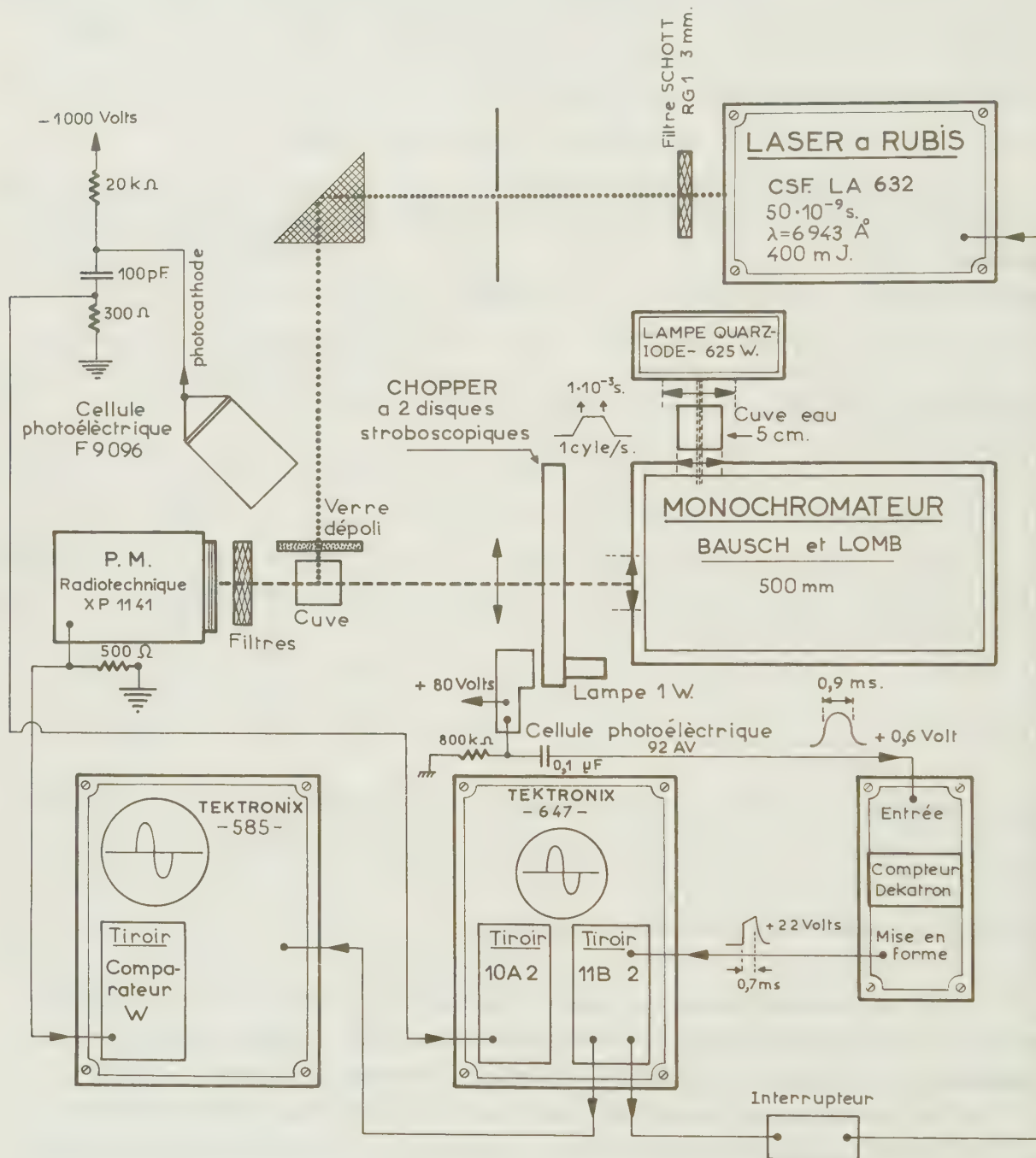
Avec les objectifs choisis, on trouve finalement : $I_{ph} > 2.10^{-4}$ A. Cette valeur est énorme ; on ne peut l'approcher qu'en utilisant des intensités lumineuses analytiques très importantes et des photomultiplicateurs à très large domaine de linéarité en courant.

f) parmi les autres contraintes expérimentales il faut citer la nécessité d'une excitation homogène, ainsi que l'existence, après l'excitation de structures photosynthétiques, d'une fluorescence retardée qui gêne les mesures dans un certain domaine de longueurs d'ondes.

Parmi les points favorables, sur le plan expérimental, nous mentionnerons le fort coefficient d'extinction des pigments étudiés ($\epsilon_{\max} \sim 10^5$), ainsi que la largeur des bandes d'absorption qui autorisera à se contenter souvent d'une large bande passante pour le monochromateur d'analyse (3 à 10 nm).

B-1-3 Description des solutions adoptées

Le dispositif de spectroscopie par éclairs est schématisé sur la figure 5. Ce schéma a souvent été changé, dans le détail, suivant les besoins expérimentaux.



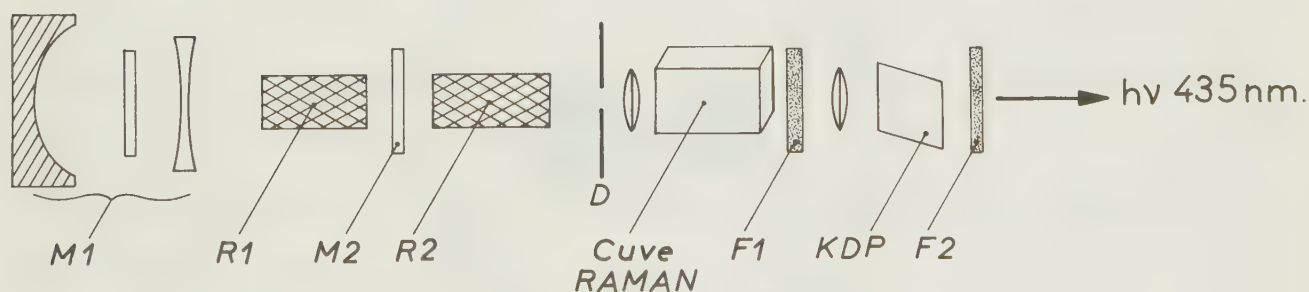
- Figure 5 -

Schéma du dispositif de spectroscopie par éclairs

B-1-3-1 Dispositif d'excitation

Dans la plupart des expériences l'éclair excitateur était fourni par un laser à rubis (LA 632, CSF). Ce laser, refroidi à l'air comprimé, est déclenché par un verre non linéaire ; il délivre, toutes les 100 secondes, une impulsion d'environ 1 J (durée 20 ns ; puissance crête d'environ 50 MW). La longueur d'onde d'émission est de 6943 Å. Dans sa version initiale ce laser comporte deux rubis (un oscillateur et un amplificateur), excités chacun par un tube-éclair en spirale, de puissance électrique 1 600 J (52 μF, 8 kV). Néanmoins la plupart des expériences ont été effectuées avec un seul rubis (énergie 400 mJ, soit $1,4 \cdot 10^{18}$ photons). L'énergie de l'impulsion a été mesurée de temps à autre, pour contrôle, avec une thermopile balistique (TRG, modèle 101). Un filtre Schott RG 2,3 mm (coupure en-deçà de 630 nm) a toujours été disposé juste à la sortie du laser pour couper la lumière de l'éclair de pompage. L'impulsion pouvait être atténuée par des filtres gris (Schott, type NG) ou des cuves remplies d'une solution de sulfate de cuivre. Nous avons vérifié que la transmission de ces filtres ne variait pas avec l'énergie de l'impulsion laser. Pour rendre le faisceau plus homogène, un verre dépoli a toujours été placé sur son trajet, à 1 cm de la cuve, ou à 20 cm, une lentille f 50 mm formant l'image du dépoli sur la cuve.

Les deux rubis ont été utilisés pour les expériences de changement de fréquence : à partir de l'impulsion laser rouge il est possible d'obtenir une impulsion de lumière violette (435 nm) en utilisant deux effets non-linéaires successifs : effet Raman stimulé et doublement de fréquence par un cristal de KH_2PO_4 (figure 6). L'énergie recueillie après l'effet Raman sur le cyclohexane (et sélection de la raie Stokes vers 8700 Å) est de 60 mJ. L'énergie en lumière violette est de l'ordre de 1 mJ ou $2,2 \cdot 10^{15}$ photons (puissance crête comprise entre 20 et 100 kW).



- Figure 6 -

Schéma du laser et du système de changement de fréquence

M_1 : miroir arrière (système afocal comportant le verre non linéaire). M_2 : miroir avant - R_1 : rubis oscillateur - R_2 : rubis amplificateur - D : diaphragme - KDP : cristal de KH_2PO_4 , doubleur de fréquence - F_1 : filtre Schott RG 9 (2 x 4 mm) - F_2 : solution de CuSO_4 ($\text{DO}_{\text{max}} \sim 12$).

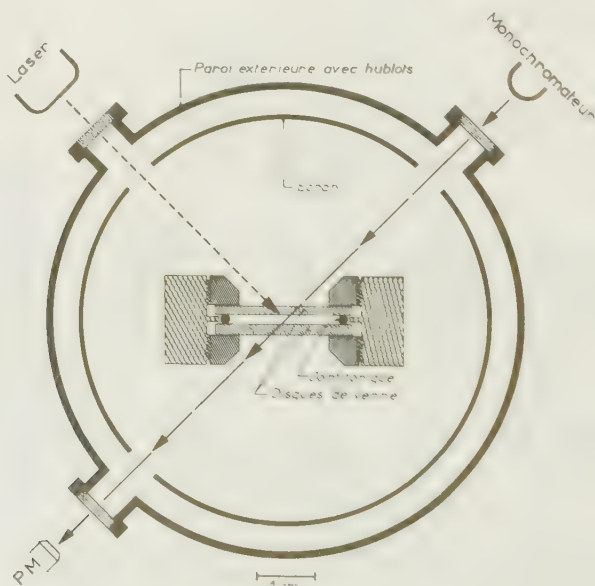
Dans certaines expériences, en particulier avec le bleu de toluidine, l'éclair exciteur était fourni par un tube-éclair conventionnel au xénon, 40 μ F, 1300 V (durée 30 μ s au tiers de la hauteur).

B-1-3-2 Cuves de mesure

Dans les expériences à température ordinaire le milieu étudié est contenu dans une cuve spectrophotométrique (10 x 10 mm), modifiée de la façon suivante. Une face, opposée à l'éclair exciteur, est argentée de façon à renvoyer vers la cuve la lumière non absorbée, dans le but d'augmenter et de rendre plus homogène l'excitation du milieu. La cuve est surmontée d'une partie arrondie qui communique avec deux boules d'environ 6 ml, qui servent pour les dégazages et pour les mélanges de réactifs. La cuve se termine par un rôdage mâle où s'adapte un robinet à vide. Les cuves utilisées sont adaptables, pour faire le spectre d'absorption, sur les spectrophotomètres Cary 14 et 15. Les rôdages ont été lubrifiés avec de la graisse à vide aux silicones. Le porte-cuve peut être thermostaté entre +5 et +50 °C.

Le dégazage des solutions a été effectué sous vide, par une série de congélations dans l'éthanol fondant et de réchauffements, 4 ou 5 cycles sous un vide de 10^{-4} torr. Il a été montré qu'un tel dégazage pouvait être insuffisant pour étudier des cinétiques lentes [108] ; dans ce cas l'oxygène a été chassé par un balayage avec de l'azote gaz (Air liquide, qualité U).

Les mesures à basse température ont été effectuées dans un tube à essai plongé dans un Dewar non argenté sur une bande, et contenant de l'éthanol refroidi à la carboglace ou à l'azote liquide (jusque -90 °C) ; ou bien elles ont été effectuées dans un cryostat à azote liquide. Dans ce cas la cellule de mesure est constituée de deux disques de verre emprisonnant le milieu étudié (glycérol 80- eau 20 - épaisseur 1 mm). L'ensemble est serré dans une masse de laiton doré directement brasée sur le récipient contenant l'azote liquide (figure 7). La cellule peut être disposée dans le Cary 14 pour faire le spectre d'absorption.



- Figure 7 -
Cellule à basse température, coupe horizontale.

L'intérieur de l'enceinte est sous vide. L'écran est à la température de l'azote liquide. Le matériel étudié est disposé entre les deux disques de verres ($e \sim 1$ mm).

B-1-3-3 Dispositif d'analyse et de synchronisation

La lumière d'analyse est rendue monochromatique par un monochromateur à réseau, Bausch et Lomb 500 nm ("blaze" à 500 nm). Le monochromateur a toujours été disposé avant la cuve pour envoyer aussi peu de lumière que possible sur l'échantillon. Deux dispositifs ont été utilisés :

a) une source continue, lampe quartz-iode 625 W, alimentée sur le secteur à travers un autotransformateur, ou par un redresseur dans les dernières expériences. Une cuve d'eau de 5 cm est disposée avant l'entrée du monochromateur. A la sortie de celui-ci le faisceau est haché par un dispositif (chopper) constitué de deux disques tournant à 9 et 10 t.s⁻¹ respectivement, l'ensemble formant stroboscope et délivrant chaque seconde un créneau de 10⁻³ s.

Pour synchroniser le déclenchement du laser avec l'ouverture du chopper, les deux disques stroboscopiques sont percés de deux petits orifices qui arrivent en coïncidence un peu avant les ouvertures principales. De part et d'autre sont disposées une lampe 0,5 W et une cellule photoélectrique (Dario, 150 AV). L'impulsion reçue par la cellule déclenche le tiroir d'entrée d'un compteur dont on prélève l'impulsion d'avancée, à chaque centaine. Cette impulsion déclenche un premier oscilloscope (Tektronix 647) qui délivre lui-même deux impulsions :

- une impulsion non retardée, qui sert à commander l'oscilloscope de mesure, muni lui-même d'une base de temps retardée d'une façon réglable ;

- une impulsion retardée qui commande le dispositif d'excitation (laser ou tube-éclair), le retard étant ajusté pour que l'éclair tombe dans le créneau.

Ce système, un peu complexe, donne en fait beaucoup de souplesse et permet de synchroniser un système mécanique périodique avec un système excitateur de période différente (1 Hz pour le stroboscope, 10⁻¹ pour le tube-éclair, 10⁻² pour le laser). Ce système permet en outre de mesurer l'énergie de l'éclair excitateur ; celle-ci est mesurée sur l'oscilloscope 647, en valeur relative, grâce à une cellule photoélectrique (CSF, F 9096).

b) un tube-éclair conventionnel (type VQX CA 23, de Verre et Quartz) alimenté sous 1,3 kV et 30 μ F (durée 30 μ s au tiers de la hauteur). Le tube est déclenché par une ionisation : l'impulsion de sortie d'un thyatron 3 C45 est envoyée sur le primaire d'une bobine de voiture dont le secondaire est relié à une petite plaque d'aluminium appliquée contre le tube. Pour la synchronisation de cet éclair analytique avec le laser, on utilise le même oscilloscope que précédemment (Tektronix 647), déclenché manuellement à la cadence voulue. Cet oscilloscope sert aussi à mesurer la forme et l'amplitude de l'éclair analytique, ainsi que l'énergie du laser (voir figure 9, tracé de droite).

Ce tube-éclair est utilisé pour les cinétiques dans les temps courts, où il est nécessaire d'avoir une lumière analytique intense, tout en conservant un produit Ixt faible, pour éviter la saturation du photomultiplicateur et minimiser la perturbation du milieu étudié.

Après traversée de la cuve de mesure, le faisceau analytique est reçu par un tube photomultiplicateur (XP 1141 ou 56 CVP) dont la sortie est connectée au tiroir d'entrée de l'oscilloscope de mesure (Tektronix 585). Les détails du montage des PM sont dans l'annexe 1.

Le PM est protégé des lumières parasites (éclairage excitateur, fluorescences du milieu) par des filtres choisis au mieux suivant la longueur d'onde d'analyse : filtres absorbants (Schott ou Kodak Wratten) et filtres interférentiels (MTO ou Balzers). Toutefois il subsiste toujours une petite perturbation (parasite laser), dont l'importance est parfois non négligeable (phase rapide dans la figure 46, 491 nm). Au sujet des perturbations, nous avons été gêné par une perturbation du potentiel de la masse au cours de l'éclair de pompage du laser (ex. figure 25). Cela ne fausse pas les mesures mais les rend plus délicates du fait que la ligne de base est plus ou moins en pente.

B-1-3-4 Enregistrement et interprétation des résultats

Les tracés oscilloscopiques sont enregistrés en vraie grandeur par un appareil photo Polaroid, 3 000 ASA. Les simples mesures de variation de densité optique sont effectuées en prenant la hauteur h (cm) du signal sur la photo. L'amplitude A (volts) du créneau de lumière d'analyse est mesurée avant chaque tracé. Si s ($V \cdot cm^{-1}$) et s la sensibilité de l'oscilloscope pour la mesure de ΔDO , on a :

$$\Delta DO = \frac{-\Delta I}{2,3 \cdot I} = -\frac{1}{2,3} \cdot \frac{s \cdot h}{A}$$

Pour les calculs cinétiques les photos ont été agrandies (x6) à l'aide d'un épidiastroscope et les tracés recopiés sur papier millimétré. Pour l'analyse des cinétiques simples nous avons suivi la méthode décrite par LIVINGSTON [110]. Dans l'exposé qui suit nous ferons généralement une application implicite de la loi de BEER, en interprétant directement en variations de concentration les variations de DO mesurées.

Dans certains cas il a été intéressant d'obtenir la quantité totale q d'intermédiaire formé. Si la durée de cet intermédiaire est grande vis à vis de son temps de formation, cela n'offre pas de difficulté : si v (litre) est le volume de la cuve, et c (M) la concentration en intermédiaire, on a :

$$q = v \cdot c_{\max} = v \cdot \frac{\Delta DO_{\max}}{\epsilon} \quad (\text{trajet optique de la cuve : 1 cm})$$

Par contre si la durée de vie de l'espèce transitoire est du même ordre de grandeur que le temps de formation, il faut considérer la surface du tracé oscilloscopique.

Pour la mesurer nous avons projeté la photo, avec un épidiastroscope, sur une feuille de papier ; la surface de papier comprise entre la ligne de base et le tracé est découpée et pesée. Connaissant le grandissement et le poids de l'unité de surface de papier, on obtient la surface S (cm^2) du tracé oscillographique. Si b ($s \cdot cm^{-1}$) est l'inverse de la vitesse de balayage de l'oscilloscope, et si l'on pose $q = v \cdot C$ (C est la concentration qu'aurait l'espèce transitoire si elle était formée instantanément), on peut écrire :

$$\int_0^{\infty} \Delta DO \cdot dt = \int_0^{\infty} \epsilon \cdot c(t) \cdot dt = \epsilon \cdot C \cdot \tau \quad (\text{on suppose une décroissance exponentielle, de durée de vie } \tau).$$

On en tire :

$$C = \frac{1}{\epsilon \cdot \tau} \int_0^{\infty} \Delta DO \cdot dt = \frac{1}{\epsilon \cdot \tau} \int_0^{\infty} \frac{1}{2,3} \times \frac{s \cdot h(t)}{A} dt$$

or
$$\int_0^{\infty} h(t).dt = S.b \quad \text{d'où :} \quad C = \frac{1}{2,3} \times \frac{s.S.b}{\epsilon \tau A}$$

soit encore :

$$C = \frac{1}{\epsilon \tau} \times T \quad , \quad \text{où} \quad T = \frac{s.S.b}{2,3.A} \quad (\text{en secondes})$$

La valeur de T peut être mesurée directement, sans faire d'hypothèse sur la valeur de τ , de ϵ , ni sur la vitesse de formation de l'espèce transitoire.

B-2 - Pigments et matériel biologique

Nous décrivons ici la préparation des caroténoïdes, de la chlorophylle, du bleu de toluidine, des micelles de digitonine, ainsi que des chloroplastes et des fragments obtenus par divers traitements.

Les principaux solvants organiques utilisés ont été les suivants : acétone (Merck,RP) éthanol (Prolabo,RP) ; éther éthylique (Touzart et Matignon, anesthésique) ; éther de pétrole (Prolabo, redistillé, fraction 50 - 60°C) ; glycérol (UCB, glycérine pour analyse) ; hexane et sulfure de carbone (Matheson Coleman, qualité spectroscopique).

B-2-1 Caroténoïdes

La majeure partie des expériences avec le carotène (entièrement trans ou 15-15' cis) ont été effectuées avec un produit cristallisé synthétique, don de la société Hoffman-Laroche. Nous avons aussi préparé du carotène à partir de feuilles de maïs étiolées.

La zéaxanthine provient des laboratoires du professeur KARRER, don de C.TRIC.

Les autres xanthophylles ont été préparées à partir de feuilles de maïs étiolées [36]. Celles-ci sont broyées dans de l'acétone froid ; le broyat est filtré puis évaporé. On reprend les pigments avec de l'éther de pétrole et on chromatographie sur colonne de poudre de cellulose, en éluant avec de l'éther de pétrole contenant une concentration croissante en acétone. On recueille en premier le carotène, puis dans l'ordre, lutéine, isolutéine, violaxanthine, néoxanthine.

Les caroténoïdes sont conservés à sec, sous vide, au froid et à l'abri de la lumière. La pureté des produits est simplement contrôlée par le spectre d'absorption dans différents solvants. Les concentrations ont été évaluées à partir du spectre d'absorption, en prenant comme coefficient d'extinction molaire au maximum [63] :

carotène	: 138 000 (hexane), 451 nm
lutéine	: 145 000 (éthanol), 446 nm
zéaxanthine	: 138 000 (éthanol), 451 nm

B-2-2 Chlorophylle A

La chlorophylle A a été préparée à partir de feuilles d'épinards que l'on broie dans l'acétone froid [41]. Le broyat est filtré sur verre fritté ; au filtrat on ajoute de l'éther de pétrole, dans lequel les pigments sont transférés par un lavage abondant à l'eau distillée. On lave ensuite avec un mélange méthanol-eau (80-20), ce qui enlève les caroténoïdes les plus polaires. La solution est ensuite évaporée sous vide, puis reprise à l'éther de pétrole contenant 0,5 % d'acétone. La solution est alors transférée sur une colonne de poudre de

de cellulose (Whatman, standard grade) pour chromatographie. La séparation s'effectue avec de l'éther de pétrole, auquel on ajoute une concentration croissante d'acétone (jusque 5 %). Quand la chlorophylle A est bien séparée de la chlorophylle B et de la phéophytine, on dé-moule. La chlorophylle A est séparée et éluée par l'acétone sur filtre en verre fritté. On évapore sous vide et on reprend la chlorophylle dans l'éther éthylique. La chlorophylle A est conservée dans l'éther éthylique, dans un ballon sous vide, à l'obscurité, à -10 °C.

Toutes ces opérations sont effectuées dans la pénombre, en entourant de papier d'aluminium les récipients contenant les pigments. La pureté du produit en ce qui concerne les contaminants principaux (phéophytine, chlorophylle B, caroténoïdes) a été contrôlée comme l'indiquent ZSCHEILE et COMAR [192]. Les différentes préparations de chlorophylle A que nous avons utilisées peuvent être considérées comme pures d'après ces critères. Par contre il est possible que, dans certains cas, nous ayons utilisé de la chlorophylle partiellement allomérisée. Toutefois l'allomérisation, qui est une modification du cycle cyclopentanone difficile à déceler quantitativement, n'affecte pratiquement pas les propriétés spectroscopiques de la chlorophylle.

Les concentrations en chlorophylle A ont été évaluées d'après le spectre d'absorption en prenant : ϵ (660 nm) = $9,1 \cdot 10^4$ (éther éthylique) [192].

B-2-3 Purification du bleu de toluidine

Le BT commercial (Merck, qualité pour microscopie) a été purifié en deux étapes [37]. En premier lieu nous avons effectué une extraction liquide-liquide par un mélange eau-chloroforme (10-90) ; le chloroforme dissout un composé rose dont nous ignorons la nature. L'extraction est poursuivie jusqu'à ce que le chloroforme reste incolore.

La deuxième étape est une chromatographie ; la phase aqueuse précédente est récupérée, évaporée sous vide et reprise à l'éthanol. La solution alcoolique est alors mise sur une colonne de gel de silice (0,05 à 0,2 mm ; Merck) et éluée par un mélange éthanol-benzène (80-20) avec 0,5 % d'acide acétique. Sur la colonne on voit quatre bandes ; la plus importante, la deuxième à partir du bas, est le BT. La colonne est démoulée, et la partie contenant le BT est remise sur une petite colonne et éluée avec le même mélange. La solution de pigment recueillie est ensuite évaporée sous vide, puis lavée plusieurs fois (et évaporée sous vide) à l'éthanol, jusqu'à disparition de l'odeur d'acide acétique.

Le produit sec est ensuite conservé dans un ballon sous vide, à -18 °C, à l'abri de la lumière. Toutes les opérations précédentes sont effectuées à la pénombre, tous les récipients entourés de papier d'aluminium. La qualité du produit final est contrôlée par son spectre d'absorption dans l'éthanol ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) et par chromatographie sur plaque ; on ne doit voir qu'une seule bande. Les impuretés présentes au départ sont essentiellement des produits de déméthylation et d'autres colorants thiaziniques [8].

B-2-4 - Incorporation des pigments dans les micelles de digitonine

La digitonine (Merck) a été purifiée par solubilisation dans l'éthanol bouillant, puis recristallisation à froid. Une impureté jaunâtre reste dans l'éthanol. Les solutions à 1 % de digitonine ont été préparées dans un tampon phosphate (0,05 M ; pH 7,3) en portant lentement à l'ébullition. La solution est ensuite conservée environ une semaine à la tem-

pérature du laboratoire, puis filtrée sur papier. Cela permet d'éliminer les supermicelles qui se sont formées : on obtient alors une suspension de micelles, stable pendant plus de quinze jours.

Pour solubiliser les pigments on commence par évaporer à sec, dans un tube à essai, les solutions de pigments en quantité voulue (Chl A dans l'éther éthylique, lutéine dans l'éthanol). On reprend par le volume désiré de solution de digitonine. En chauffant à 50 ° pendant 15 minutes on fait passer les pigments en solution. La solution est ensuite homogénéisée dans un tube de potter, puis laissée 3 jours à température ambiante, à l'abri de la lumière. Ensuite on centrifuge 20 minutes à 15 000 g, ce qui permet d'éliminer un culot composé de pigments non dissous, et d'obtenir un surnageant parfaitement limpide et stable au moins une semaine.

La préparation appelle certaines remarques :

a) il y a un risque de dégradation des pigments par chauffage. Nous avons vérifié que le chauffage à sec, sous vide, à 65 °, ne faisait évoluer ni la Chl A ni la lutéine. De plus les pigments dissous dans les micelles puis repris dans l'éthanol ou l'acétone, après lyophilisation, ont un spectre d'absorption normal. On ne peut quand même pas exclure que la chlorophylle soit allomérisée par le chauffage, en présence d'air, à pH légèrement alcalin.

b) le rendement de solubilisation est faible pour la lutéine (moins de 15 %). Il est meilleur pour la chlorophylle où il atteint 100 % si le rapport molaire digitonine/Chl A est supérieur à 30. Pour augmenter la solubilisation de la lutéine il faudrait augmenter la concentration en digitonine, au détriment de la stabilité des solutions.

c) il est nécessaire que les concentrations relatives en digitonine et en pigments soient bien définies. En effet, pour qu'il y ait des micelles, il ne faut pas diluer la solution stable de digitonine obtenue (de concentration non connue exactement, comprise entre 0,5 et 1 %) et par ailleurs il faut que la concentration en pigments soit suffisante pour qu'il y ait une bonne probabilité d'avoir, dans une même micelle, au moins une molécule de Chl A et une de lutéine. Toutes les préparations ont été effectuées avec de petites quantités de solution de digitonine (~ 1 ml), très concentrées en pigments. Ces solutions ont été ajustées à la concentration voulue juste avant les manipulations, en diluant avec le même tampon phosphate.

d) phéophytinisation. Dans plusieurs préparations nous avons observé une phéophytinisation partielle de la chlorophylle dans des micelles en présence de lutéine, mais jamais avec Chl A seule. Nous nous expliquons mal cet effet, qui ne peut pas provenir de traces d'acidité amenées par la lutéine ou son solvant. Il est possible que l'interaction d'un hydroxyle de la lutéine avec le Mg de la chlorophylle affaiblisse la liaison Mg-tétrapyrrole, et favorise la phéophytinisation. Pour minimiser cet effet, le pH a été fixé à 7,3.

B-2-5 Matériel biologique

Nous avons essentiellement utilisé des chloroplastes d'épinards et des particules obtenues par traitement de ces chloroplastes.

- Chloroplastes. Ceux-ci sont obtenus par broyage de feuilles d'épinards du commerce, dans un milieu isotonique. Nous avons utilisé le milieu saccharose 0,4 M - NaCl 0,01 M -

Tris 0,02 M ; pH 8,0. La méthode est classique [75].

- Chloroplastes cassés. Les chloroplastes sont lavés deux fois à l'eau distillée puis laissés une nuit dans l'eau distillée, à 4°. Dans ce milieu hypotonique les chloroplastes éclatent. On centrifuge alors deux fois (10 minutes à 1000 g) pour éliminer les chloroplastes entiers et les fragments trop gros. Le surnageant est centrifugé (10 minutes à 8000 g) ; le culot est repris dans un tampon phosphate (pH 6,5 ; $2 \cdot 10^{-3}$ M) et homogénéisé dans un tube de Potter.

- Lamelles. Celles-ci sont obtenues par passage de chloroplastes cassés à travers une presse de French réfrigérée (les chloroplastes sont forcés, à la pression de 2,5 t. cm^{-2} , à travers un petit orifice). Le broyat est centrifugé 30 minutes à 10 000 g ; le surnageant est une suspension de lamelles. Avant le broyage on ajoute $5 \cdot 10^{-3}$ M d'ascorbate pH 7,0.

C - ETAT TRIPLET DES CAROTENOIDES. TRANSFERT D'ENERGIE TRIPLET-TRIPLET DE LA CHLOROPHYLLE A AUX CAROTENOIDES

Dans ce chapitre nous faisons un exposé des expériences qui nous ont conduit d'une observation faite sur des chloroplastes à son interprétation physico-chimique à l'aide de systèmes modèles.*

C-1 Variation d'absorption de courte durée de vie induite dans des chloroplastes par un éclair laser

Plusieurs auteurs ont montré que l'éclairement de structures photosynthétiques entraînait une augmentation transitoire d'absorption vers 515 nm [55] [64] [74] [181]. WITT et coll. ont bien montré que le phénomène était complexe et que le retour de l'absorption à son niveau initial, après un éclair, était nettement polyphasique [182].

C-1-1 Observations de base

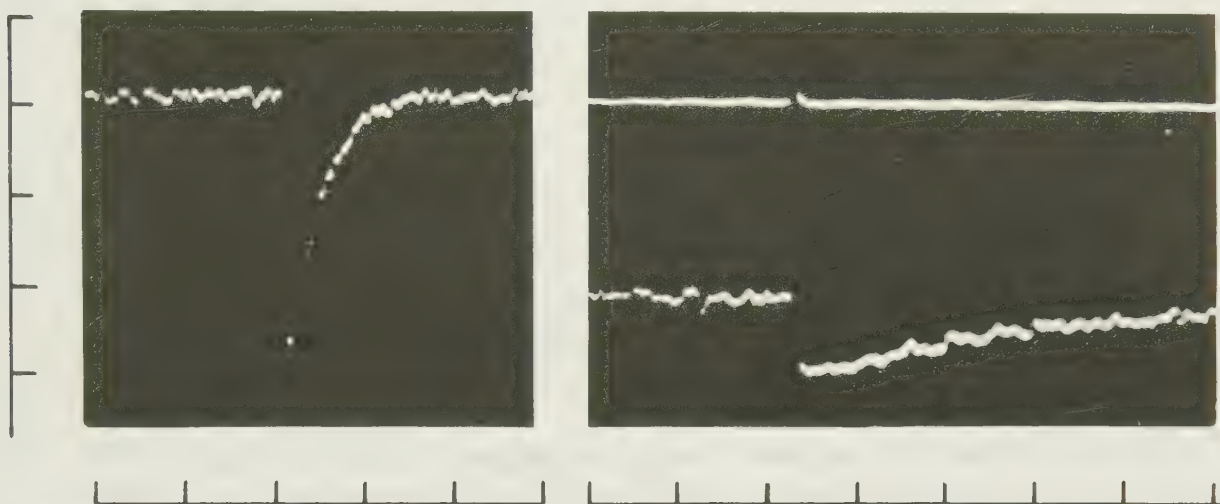
Des premiers essais, avec des chloroplastes laissés environ une heure dans un milieu hypotonique (tampon phosphate 10^{-2} M ; pH 6,5), nous ont donné, à 515 nm, après un éclair laser, une augmentation de DO avec un retour comportant une phase rapide (quelques μs) et une phase lente ($> 50 \mu\text{s}$). Si par contre les chloroplastes ont séjourné une nuit en milieu hypotonique, seule subsiste la phase rapide ; c'est elle que nous avons essayé d'étudier.

La figure 8 représente un exemple de signal obtenu avec des chloroplastes cassés, en suspension dans un mélange glycérol-eau 80-20. On voit que le retour à l'absorption initiale se fait suivant une cinétique simple, avec $t_{1/2} = 3 \mu\text{s}$; un ensemble de mesures dans les mêmes conditions donne $t_{1/2} = 3,0 \pm 0,5 \mu\text{s}$. Sur la figure 8 (tracé de droite) on voit également que le temps de montée est très court, inférieur à $2 \cdot 10^{-7}$ s ; la montée est légèrement perturbée par un parasite laser.

* Une partie des expériences décrites ici a déjà été publiée (réf. 14, 123, 124, 125, 126)

La figure 9 montre la diminution de DO observée dans des conditions semblables, à 422 nm. A cette longueur d'onde les mesures sont rendues difficiles par l'absorption importante de l'ensemble des pigments du chloroplastes ; la mesure a donc été effectuée avec un tube éclair comme source de lumière analytique. Pour des raisons techniques le sens des signaux est le même sur les deux figures : sur la figure 8 on a une augmentation de DO vers la bas.

Les mesures précédentes ont été effectuées sous air. Dans ces conditions le $t_{1/2}$ dépend du milieu : 2 μ s dans l'eau distillée, 3 μ s dans le glycérol.



- Figure 8 -

Oscillogrammes montrant la variation de DO, à 511 nm, obtenue par excitation laser de suspensions de chloroplastes cassés, en suspension dans un mélange glycérol-eau 80-20. Cuve 10 mm, sous air.

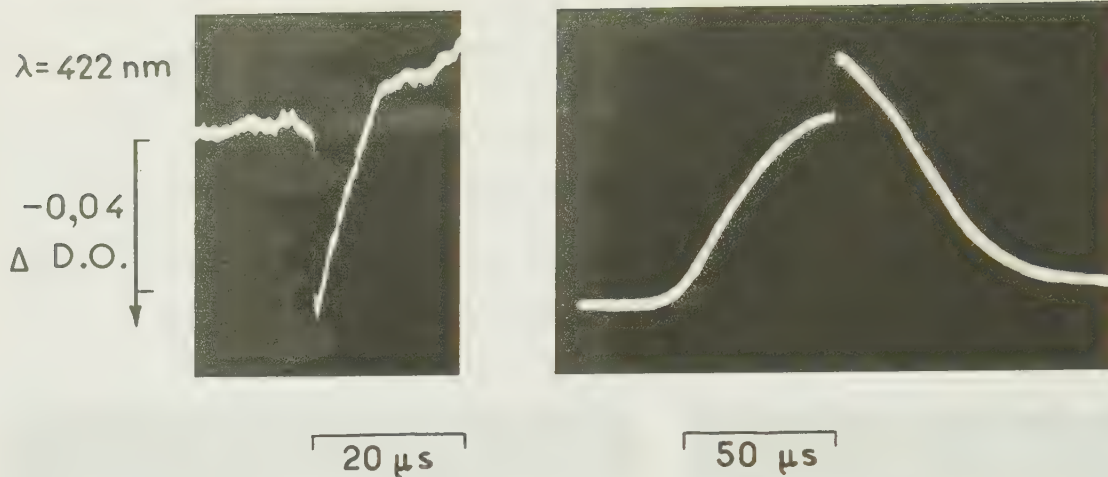
Augmentation de DO vers le bas. $R_c = 1 \text{ k}\Omega$.

Tracé de gauche : teneur totale en chlorophylle : $15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Balayage : 10 μ s par carreau. Echelle verticale : $9 \cdot 10^{-3} \text{ DO}$ par carreau.

Tracé de droite : teneur totale en chlorophylle : $10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Balayage : 2 μ s par carreau. Le tracé du haut est un parasite lumineux, dû au laser seul, en l'absence de lumière d'analyse (5 mV par carreau). Le tracé du bas est une variation de DO (10 mV soit $20 \cdot 10^{-3} \text{ DO}$ par carreau).



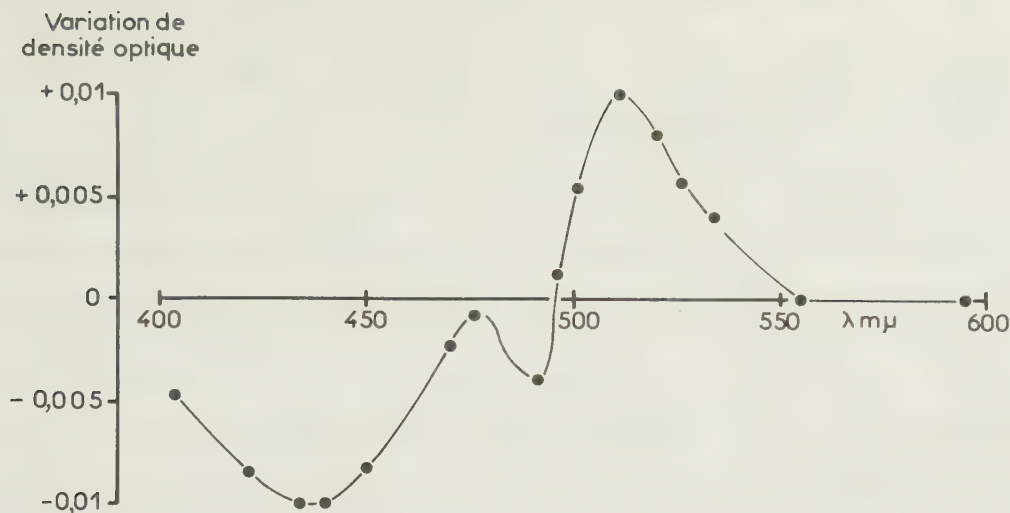
- Figure 9 -

Mêmes éléments que figure 8, sauf concentration 48.10^{-6} M . Pour la mesure l'éclair laser est synchronisé avec l'éclair analytique : le tracé de droite montre cet éclair analytique et, superposé, le signal d'une cellule photoélectrique qui reçoit l'éclair laser (le signal est intégré par un circuit RC). Tracé de gauche : diminution de DO.

C-1-2 Spectre de différence

Si l'on fait varier la longueur d'onde de la lumière d'analyse, entre 400 et 560 nm, on trouve partout un signal ayant les mêmes caractéristiques cinétiques. Sur la figure 10 nous avons porté la variation de densité optique ΔDO , mesurée au maximum de chaque signal, en fonction de la longueur d'onde d'analyse (spectre de différence). Le spectre est obtenu avec une bande passante $\Delta \lambda = 10 \text{ nm}$. Les mesures sont peu précises entre 400 et 490 nm, à cause de l'absorption de tous les pigments photosynthétiques. Au delà de 600 nm on est gêné par la fluorescence de la chlorophylle. Nous avons effectué des mesures à deux longueurs d'onde (à 658 et 680 nm) en utilisant un tube-éclair comme source de lumière d'analyse ; on observe une diminution de DO, mais nous n'avons pas décelé de signal de courte durée d'amplitude supérieure à 10 % du signal à 511 nm.

Le spectre de différence donne des indications par ses parties négatives : la DO ne peut diminuer que là où un pigment absorbe. L'excitation se fait à 694 nm, longueur d'onde où seule la chlorophylle A absorbe d'une façon non négligeable dans le chloroplaste ; or la diminution de DO ne peut être imputée à la seule chlorophylle A qui n'absorbe pratiquement pas à 490 nm, où apparaît le deuxième pic de diminution de DO. Il faut donc faire intervenir d'autres pigments qui absorbent à 490 nm : la chlorophylle B ou les caroténoïdes. Ces derniers sont probablement concernés puisqu'un changement dans la chlorophylle B se traduirait à priori par un changement dans sa bande d'absorption située vers 650 nm.



- Figure 10 -

Spectre de différence variation de DO en fonction de la longueur d'onde d'analyse. Chloroplastes cassés, en suspension dans du glycérol-eau 80-20, excités par l'éclair laser. Teneur en chlorophylle : $16 \cdot 10^{-6}$ M, $\Delta\lambda = 10$ nm.

C-1-3 Influence des gaz paramagnétiques

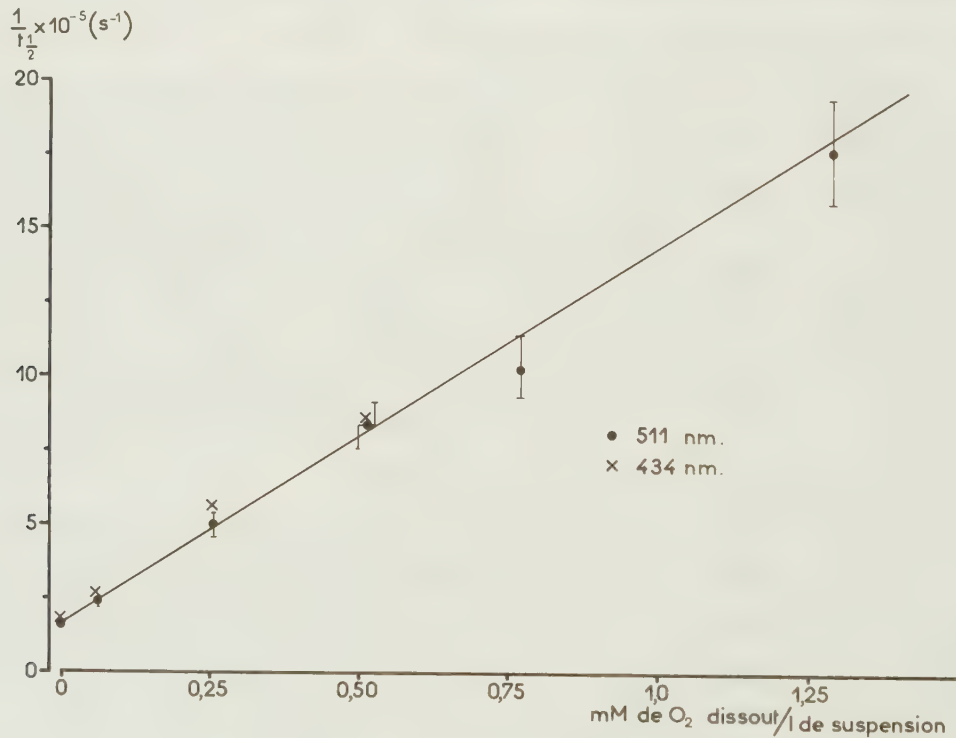
La constatation de base est que la variation de DO décrite précédemment a un temps de vie plus long sous azote que sous air. On sait que les solutés paramagnétiques réagissent avec les états triplets et les radicaux en solution [142] (ce point sera développé au paragraphe E). Pour voir si l'état formé par excitation laser de chloroplastes avait ces propriétés, nous avons étudié l'action de l'oxygène et de l'oxyde nitrique NO. Ce travail a été effectué sur des chloroplastes cassés, en suspension dans l'eau distillée. Nous avons préféré l'eau au glycérol pour des raisons de vitesse de mise à l'équilibre des gaz, mais nous avons vérifié que les résultats étaient qualitativement identiques. Les mesures ont été effectuées à 23 °C (viscosité de l'eau : 0,936 cp ; $k_{\text{diffusion}} = 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) sur des suspensions dont la teneur en chlorophylle était voisine de $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Pour les mesures en présence d'oxygène nous avons préparé une série de mélanges O_2 - N_2 en proportion variable. La cuve spectrophotométrique est mise en relation avec une cuve ampérométrique comportant une électrode de Clark, à membrane de téflon, qui permet la mesure de la concentration en O_2 de la suspension. Cette concentration est imposée par un courant gazeux qui barbote dans le liquide et qui le force à circuler ; l'équilibre est atteint au bout de 15 à 30 minutes, cet équilibre étant constaté par un palier du courant de la cellule ampérométrique. La concentration réelle est obtenue après étalonnage de la cellule avec de l'eau saturée d'air ; on recoupe la valeur par application de la loi de Henry.

Pour le travail avec NO la solution et les canalisations sont préalablement débarrassées d'oxygène par un balayage d'azote. On fait ensuite barboter NO pendant 5 minutes dans la suspension, et on effectue la mesure de ΔDO . On peut ensuite chasser NO par un courant d'azote pour voir la réversibilité. Disons tout de suite que l'on peut bien constater la réver-

sibilité en ce qui concerne la durée de vie du signal, mais pas pour son amplitude : le barbotage à l'azote, destiné à chasser NO, provoque une floculation partielle des chloroplastes qui viennent se coller sur les parois supérieures de la cuve et la concentration en chloroplastes diminue. Il est donc probable que NO exerce d'autres effets que des effets purements physiques dus à son paramagnétisme.

Suivant la teneur en oxygène, la demi-vie de la variation d'absorption varie de 6,1 μs (valeur mesurée sous N_2 ou sous vide) à 0,6 μs (sous une atmosphère d'oxygène). Les résultats obtenus à 511 nm sont représentés sur la figure 11, où nous avons porté $t_{1/2}^{-1}$ en fonction de la concentration en O_2 du milieu. Chaque point représente la moyenne d'au moins 20 mesures ; l'intervalle de sécurité représenté sur la figure est estimé à la probabilité de 99 %. Nous n'avons pas représenté une cause d'erreur au moins aussi importante que les fluctuations de $t_{1/2}$: il s'agit de l'erreur sur la détermination de la concentration en O_2 . On peut considérer que les points s'alignent sur une droite, ce qui traduit une réaction bimoléculaire entre l'état transitoire et l'oxygène dissous. A 434 nm (figure 11) nous avons pu effectuer des mesures aux faibles concentrations en oxygène ; aux fortes concentrations le signal, très court, est perturbé par un parasite laser. Les valeurs obtenues ne diffèrent pas significativement de celles obtenues à 511 nm. A 491 nm les mesures sont encore plus difficiles car la variation de DO est moindre ; nous avons pu vérifier que, sous N_2 , on a $4 < t_{1/2} < 7 \mu s$, et sous une atmosphère de O_2 : $t_{1/2} < 2 \mu s$.



- Figure 11 -

Variation de l'inverse de la demi-vie ($t_{1/2}$) en fonction de la concentration en oxygène de la suspension.
Mesures effectuées à 511 et 434 nm ; aux deux longueur d'onde la décroissance est exponentielle. Concentrations en O_2 : $\pm 5 \%$. $R_c = 0,5 \text{ k}\Omega$.

NO a le même effet que l'oxygène. Sous une atmosphère de NO, $t_{1/2}$ tombe à 1,4 μ s. Nous n'avons pas mesuré la concentration en NO dissous.

A 511 nm la variation de DO initiale est un peu plus faible (20 % en moins) sous O₂ ou sous NO que sous N₂. En fait cette différence provient essentiellement de la perturbation due au parasite laser, ainsi que d'une légère limitation instrumentale (temps de réponse du système d'analyse) : l'importance relative de ces deux facteurs augmente quand la durée de vie est courte. Si l'on extrapole le signal au temps zéro, dans l'approximation d'une décroissance exponentielle, on ne trouve pas de différence supérieure à 10 %. En première approximation nous pouvons donc admettre que la nature du gaz dissous n'affecte pas l'amplitude de la variation de DO au temps zéro.

Les résultats obtenus en présence d'oxygène peuvent s'interpréter en admettant qu'un état métastable M est créé rapidement par l'éclair excitateur (en moins de $2 \cdot 10^{-7}$ s), trop vite pour que l'oxygène puisse réagir avec les intermédiaires éventuels. M peut revenir à son état initial suivant une réaction du premier ordre, de constante de vitesse k_1 , ou réagir avec l'oxygène avec une constante de vitesse k_2 . Si l'on admet que l'augmentation de DO à 511 nm est proportionnelle à (M), en application de la loi de Beer, on trouve aisément :

$$t_{1/2} = \frac{\text{Log } 2}{k_1 + k_2 [O_2]}$$

La figure C4 permet d'obtenir les deux constantes :

$$k_1 = 1,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \quad k_2 = 1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

La constante de vitesse k_2 est voisine de celle d'une réaction limitée par la diffusion, dans l'eau ($k_{\text{diffusion}} = 7 \cdot 10^9$). Cela n'est pas trop surprenant car, même dans un milieu condensé comme le chloroplaste, les petites molécules comme O₂ ou NO peuvent diffuser facilement.

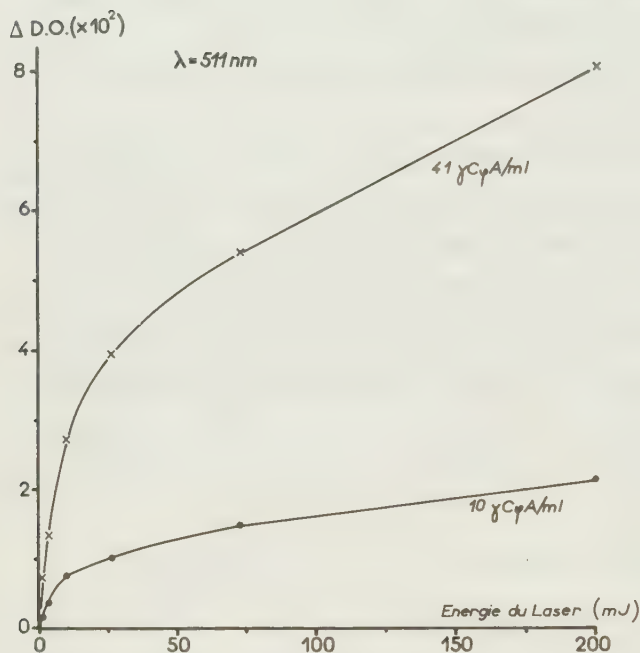
L'influence de NO, identique à celle de l'oxygène, semble indiquer que M est un état métastable paramagnétique.

C-1-4 Influence de l'intensité d'excitation

Nous avons étudié la variation de DO en fonction de l'énergie de l'impulsion laser afin de déceler d'éventuels effets biphotoniques et de voir si le phénomène se saturait (pour la plupart des phénomènes photosynthétiques on observe une saturation à un faible niveau d'excitation ; cela est dû au petit nombre d'intermédiaires par rapport à la masse des pigments collecteurs d'énergie). L'énergie du laser, en l'absence de dépoli, a été diminuée avec des filtres gris calibrés (Schott, type NG).

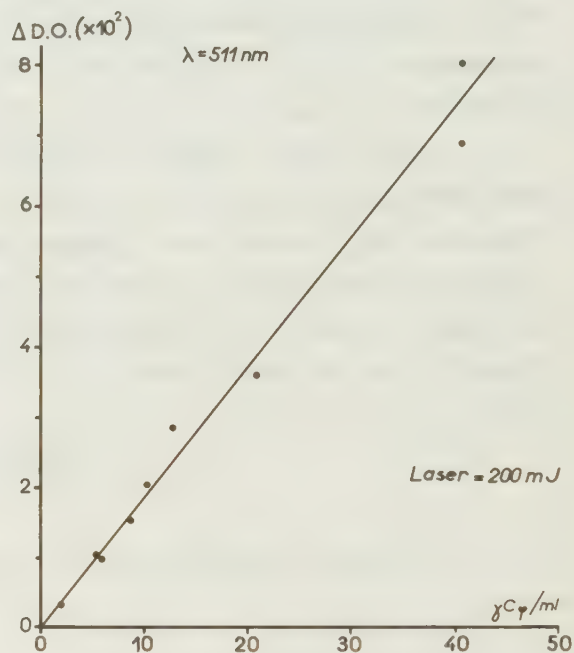
La figure 12 montre les résultats obtenus avec des chloroplastes brisés en suspension dans un mélange glycérol-eau 80-20. Sur la figure 13 nous avons reporté, pour une énergie laser de 200 mJ, la variation de DO obtenue avec différentes concentrations en chloroplastes (exprimées en concentrations en chlorophylle A).

La figure 14 montre une évolution semblable à 511 et à 440 nm ; les deux courbes ont été obtenues en utilisant un tube-éclair comme source de lumière d'analyse (cf. figure 9). Cette méthode donne des résultats peu précis, mais elle seule permet d'observer des signaux très petits (ΔDO jusque $2,10^{-3}$) à une longueur d'onde où l'absorption de l'ensemble est très forte (DO-2).



- Figure 12 -

Variation de DO (phase rapide $t_{1/2} = 3 \mu s$) de chloroplastes d'épinards cassés, en suspension dans un mélange glycérol-eau 80-20, excités avec une énergie laser variable. Deux concentrations en chloroplastes, exprimées en concentrations en chlorophylle A ($10 \gamma/ml \sim 1,1.10^{-5} M$).



- Figure 13 -

ΔDO en fonction de la concentration en chloroplastes ; comme figure 12. Énergie laser : 200 mJ.

Aux fortes énergies d'excitation, et seulement pour de faibles concentrations en chloroplastes, le signal a un retour nettement biphasique. La phase lente s'observe avec le glycérol seul, aux fortes excitations ; on peut l'attribuer à un produit résultant de processus multiphotonique sur le glycérol ou sur une impureté qu'il contient. Sur les figures 12 et 13 nous n'avons porté que l'amplitude de la phase rapide. Dans l'eau distillée (figure 14) on n'observe que la phase rapide.

Les courbes des figures 12 et 14 indiquent clairement que M n'est pas formé par un processus biphotonique ; on aurait alors une courbe parabolique. Celle-ci n'est pas due à une photo-sélection liée à la polarisation du laser ; on obtient la même ΔDO en dédoublant le faisceau-laser et en interposant sur une moitié une lame demi-onde qui fait tourner de 90° le plan de polarisation du faisceau.

La figure 13 montre qu'il y a un sens à essayer de déterminer la concentration en espèces M, absorbant à 511 nm, par rapport à la concentration en chlorophylle. Si l'on suppose que la diminution de DO à 440 nm est due à une chlorophylle ou à un caroténoïde, on peut admettre $\Delta\epsilon_{440} = 100\,000$ (c'est l'ordre de grandeur du coefficient d'extinction de ces pigments ; on suppose qu'ils n'absorbent plus dans l'état M). En prenant $\Delta DO_{511} = 1,3 \times \Delta DO_{440}$, on obtient :

$$[M] = \frac{\Delta DO_{511}}{1,3 \times 100\,000}$$

La figure 13 permet alors d'obtenir, pour

une énergie laser de 200 mJ :

$$[Chl A] = 44 [M]$$

Ce chiffre, bien que très approximatif, montre que la quasi-saturation ne provient pas d'une saturation au niveau de l'ensemble des molécules de pigments.

On peut avoir une idée du rendement maximum R de formation de M, c'est à dire du nombre de molécules de M produites pour 100 photons absorbés. Aux faibles excitations, sur la figure 12, on a approximativement (pour la plus faible concentration) en prenant $\epsilon_M = 130\,000$:

$$\Delta DO = [M] \times 130\,000 = \text{Energie laser (mJ)} \times 42 \cdot 10^{-4}$$

Sachant que la DO de la solution utilisée est de 0,35 à 694 nm, et que le volume utile de solution est de 1 ml, on peut calculer R :

$$R = 0,9 \%$$

On peut avoir une autre estimation de R en utilisant l'impulsion laser bleue ($\lambda = 435$ nm) et en comparant la formation de M avec une suspension de chloroplastes à la formation de l'état triplet de la chlorophylle A, en solution dans l'hexane non séché. En supposant un rendement de 30 % pour le passage à l'état triplet des molécules de chlorophylle A excitées on obtient :

$$R = 2,1 \%$$

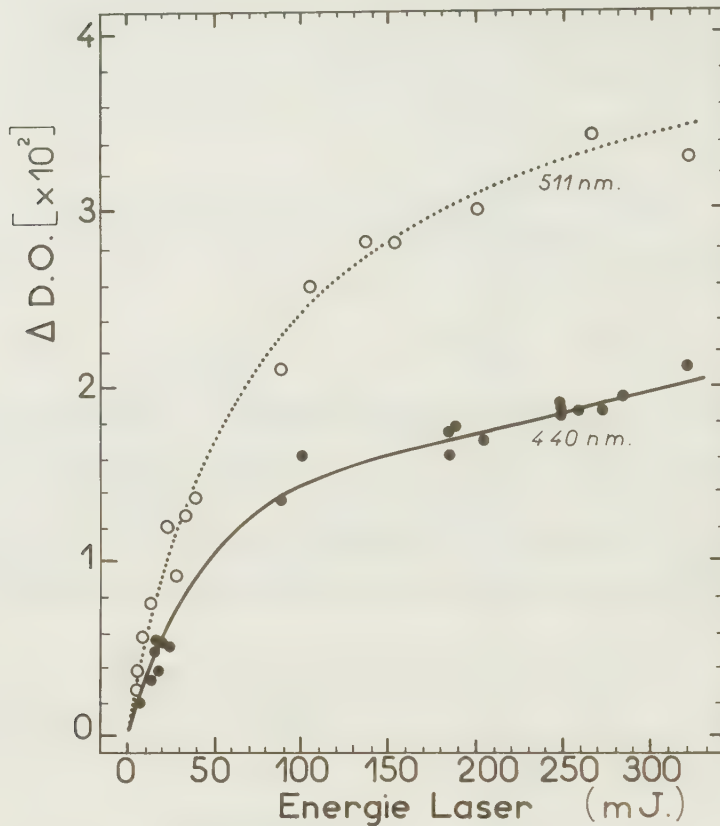
Par les deux méthodes on trouve un rendement très faible. Nous ne pouvons pas dire si la différence entre les deux résultats est significative.

C-1-5 Autres paramètres

C-1-5-1 Intensité de lumière d'analyse

Ce point mérite d'être abordé quand on sait que de très faibles intensités lumineuses suffisent pour induire certaines réactions photosynthétiques. L'éclairement énergétique au niveau de la cuve, compris entre 0,1 et 1,5 mW.cm⁻², suffirait à saturer de nombreuses réactions. Pour déceler un éventuel effet nous avons placé un filtre gris (Schott NG4,4mm, transmission 2 %) sur le trajet du faisceau analytique, avant ou après la cuve. A 511 nm et avec un éclairement de 1 mW.cm⁻² on trouve la même ΔDO et le même $t_{1/2}$ dans les deux cas. Avec 2.10⁻⁵M de chlorophylle A, dans les conditions ci-dessus, un photon est absorbé chaque seconde pour 2 200 molécules de Chl A, sans filtre (compte tenu du faible temps d'ouverture du chopper) ; avec le filtre : un photon par seconde pour 110 000 molécul-

les de Chl A. Il serait surprenant qu'une aussi faible excitation ait des effets importants.



- Figure 14 -

Variation de DO obtenue par excitation laser de chloroplastes d'épinards cassés, en suspension dans l'eau distillée, sous vide, à 511 et 440 nm, en fonction de l'énergie du laser. Les mesures de ΔDO ont été effectuées avec le tube éclair analytique, comme pour la figure C2.

Concentration, exprimée en concentration de chlorophylle A : $2,1 \cdot 10^{-5} M$.

C-1-5-2 Température

Sauf indication contraire toutes les expériences ont été effectuées à 21 °. En présence d'air on observe un effet de type viscosité : dans le glycérol, à 5 °C, la demi-vie de M est de 6 μs , pratiquement la même que sous azote. L'abaissement de la température n'a pas d'effet visible sur le temps de montée (ce point sera vu plus en détail au paragraphe C5.3). Sous vide on observe un faible allongement de $t_{1/2}$ quand on abaisse la température ; nous avons obtenu les résultats suivants, avec des chloroplastes en suspension dans un mélange glycérol-eau 80-20, sous vide :

T °K	303	291	252	205	77
$t_{1/2} \mu s$	6,0	6,1	6,5	6,9	10,2
précision sur $t_{1/2} \mu s$	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3

La température influe légèrement sur l'amplitude de ΔDO . A 77 °K on observe une augmentation d'environ 50 % par rapport à 21 °C, compte non tenu de la variation de concentration par contraction.

C-1-5-3 Facteurs chimiques jouant un rôle dans la photosynthèse

Un certain nombre de facteurs essayés ne jouent aucun rôle, ni sur $t_{1/2}$ ni sur l'amplitude de ΔDO . Citons :

le saccharose 0,4M - le milieu de photophosphorylation ($MgCl_2$, ADP, phosphate, tris pH 8), avec ou sans pyocyanine, essayé sur des chloroplastes dont nous avons contrôlé la capacité à effectuer des photophosphorylations - le pH, entre pH 4 et pH 8 - le ferricyanure de potassium (jusque $7 \cdot 10^{-3} M$) - l'ascorbate de sodium $5 \cdot 10^{-4} M$ - le DCMU $10^{-5} M$.

Certains traitements affectant irréversiblement la structure du chloroplaste seront envisagés plus loin (paragraphe C5.1).

C-1-6 Bilan sur l'état M observé dans les chloroplastes

Les différentes propriétés de l'état M, obtenu par excitation laser de chloroplastes, indiquent que le phénomène étudié est un effet physique au niveau pigmentaire, non lié directement aux processus biochimiques de la photosynthèse : absence d'influence des facteurs chimiques, faible influence de la température, absence de saturation aux fortes excitations, formation très rapide.

L'état métastable M est formé dans les chloroplastes après excitation de la chlorophylle A. Le spectre de la figure 10 montre qu'il ne s'agit pas de l'état triplet Chl A_T dont le spectre de différence est très dissemblable (voir figure 22). Le pic négatif vers 492 nm nous a fait penser que des caroténoïdes étaient impliqués. Ils pouvaient l'être pratiquement de deux manières : ou bien M est un état métastable de caroténoïdes (triplet ou radical, comme le suggère la réactivité avec O_2 et NO), ou bien on a une interaction entre chlorophylle et caroténoïde. Cette dernière hypothèse a été rejetée par suite de l'absence de signaux dans la partie rouge du spectre, où absorbe la chlorophylle.

Dans le but de préciser la nature de l'état M, nous avons essayé de le retrouver par l'étude du système chlorophylle A + caroténoïdes dans des solvants organiques.

C - 2 Transfert d'énergie Chl A_T $\rightarrow$ 3 Car en solution fluide

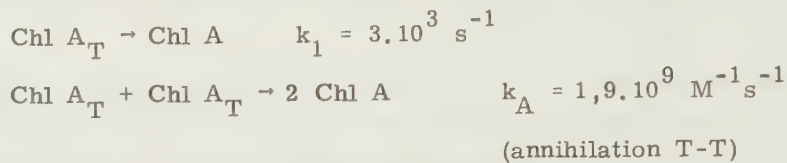
Il a été montré par des expériences de spectroscopie par éclairs que le carotène contribue à désexciter l'état triplet de la chlorophylle A [58]. La constante de vitesse de la réaction est peu inférieure à celle d'une réaction limitée par la diffusion. Avec notre technique de spectroscopie par éclairs à excitation laser nous avons étudié, dans différents solvants (CS_2 , hexane, CCl_4 , cyclohexanol) les interactions de Chl A_T avec quelques caroténoïdes : carotène, lutéine, isolutéine.

C- 2-1 Chlorophylle A seule

Les propriétés de l'état triplet des chlorophylles ont déjà été beaucoup étudiées en spectroscopie par éclairs [29] [109] [110]. L'excitation, avec les impulsions laser (rouge $\lambda = 694$ nm, ou bleue $\lambda = 435$ nm), de solutions dégazées de Chl A dans des solvants organiques permet d'observer un état transitoire qui a toutes les propriétés de cet état triplet :

- Spectre de différence caractéristique (figure 15 et 16). Dans les solvants ci-dessus on constate essentiellement une diminution de DO vers 430 nm, et une bande d'absorption diffuse avec un maximum vers 470 nm. A un décalage de longueur d'onde près, les spectres de différence sont très semblables dans les quatre solvants.

- Décroissance suivant deux réactions :



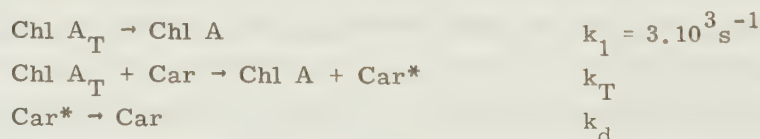
Les valeurs précédentes ont été obtenues dans le CS_2 . La constante k_1 est un peu plus grande que celle connue par certains auteurs (environ 10^3 s^{-1}) [109]. Cela peut provenir d'un dégazage insuffisant : cinq congélations et vide de 10^{-4} torr (cf. paragraphe B1.3b). La valeur de k_A est normale pour un solvant de la viscosité du CS_2 ; elle a été calculée suivant la technique décrite par LIVINGSTON [110].

- Accélération de la vitesse de retour en présence d'oxygène.

C-2-2 Chlorophylle A + Caroténoïdes

Ces expériences ont été effectuées dans des cuves surmontées de deux boules. Dans une boule est introduite la quantité voulue de carotène, que l'on sèche. L'autre boule sert pour dégazer la solution de chlorophylle. On fait d'abord les mesures de ΔDO sur la chlorophylle seule, puis on fait passer le carotène en solution et on effectue les mesures sur le mélange. L'excitation à la longueur d'onde 694 nm, absorbée par la seule chlorophylle, de solutions dégazées, permet d'observer des variations de DO suivant des cinétiques complexes, d'allure variable suivant la longueur d'onde, la concentration en pigments et la nature du solvant (ex. figure 17). Dans tous les cas la variation de DO initiale ($t < 0,5 \mu\text{s}$) est la même qu'avec la chlorophylle seule ; le peuplement en Chl A_T n'est donc pas affecté par la présence de carotène.

Dans nos conditions expérimentales on a toujours $[\text{Car}] \gg [\text{Chl A}_T]$, ce qui permet de négliger la réaction d'annihilation entre molécules Chl A_T , réaction qui introduit beaucoup de complexité dans les cinétiques de ΔDO . On peut alors représenter l'ensemble des signaux observés par le schéma suivant :



Car^* représente une forme métastable du carotène, qui présente une bande d'absorption intense centrée vers 515 nm (hexane) et 555 nm (CS_2) (figure 15, 16). Les réactions précédentes sont ralenties dans les solvants visqueux comme le cyclohexanol ou le mélange hexane-huile de paraffine : on observe alors simplement une décroissance lente de Chl A_T .

Pour calculer k_d, k_T et le coefficient d'extinction de Car*, nous avons d'abord fait une supposition sur k_d et k_T , et nous avons tracé une courbe des variations de Car* en fonction du temps, à partir du schéma précédent. Nous avons supposé un peuplement initial maximal en Chl A_T (soit T la concentration) ; cette supposition est permise car la durée du laser est courte par rapport aux temps des réactions. Nous avons aussi négligé k_1 car la concentration en carotène (soit C) est grande dans les expériences considérées (figure 17,18). On peut alors obtenir :

$$[Car^*] = \frac{k_T C T}{k_d - k_T C} \times \left[\begin{array}{cc} e^{-k_T C t} & - e^{-k_d t} \end{array} \right] = A \times h(t)$$

- pigments dans l'hexane. A 511 nm, dans le cas de la figure 17, on n'est pas gêné par l'augmentation de DO due à Chl A_T, qui est faible et disparaît très rapidement :

ΔDO (Chl A_T, 511 nm) = $1,9 \cdot 10^{-2}$ alors que ΔDO (Car*, 511 nm) = $11,5 \cdot 10^{-2}$. On obtient l'accord entre la courbe théorique $h(t)$ et la courbe expérimentale (figure 17) en faisant une série d'approximations successives sur k_d et k_T ; on trouve :

$$k_T = 4,6 \pm 0,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (\text{CHESSIN et coll. donnent } 3,2 \cdot 10^9)$$

$$k_d = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \quad \text{soit } t_{1/2} = 4,6 \mu\text{s}$$

On obtient la même valeur de k_T en suivant la décroissance de Chl A_T, mesurée à 560 nm, en présence de quantités variables de carotène. Le coefficient d'extinction est obtenu en appliquant la valeur ci-dessus pour le maximum de la courbe :

$$[Car^*]_{\text{max}} = \frac{\Delta DO(\text{Car}^*, 511 \text{ nm})_{\text{max}}}{\epsilon(\text{Car}^*, 511 \text{ nm})} = A \times h_{\text{max}}$$

Pour avoir la valeur de T nous avons pris la valeur 15 000 pour la différence des coefficients d'extinction de Chl A et Chl A_T à 511 nm [109]. On trouve alors :

$$\epsilon(\text{Car}^*, 511 \text{ nm}, \text{hexane}) = 191\,000$$

- pigments dans le CS₂. A 555 nm on obtient la ΔDO due à Car* en enlevant de la ΔDO totale la part qui revient à Chl A_T ; celle-ci n'est pas négligeable. Sa valeur à $t = 0$ est donnée par la manipulation préalable effectuée avec la chlorophylle seule ; sa valeur au cours du temps est calculée en supposant une décroissance exponentielle de constante de vitesse $k_T C$. En procédant comme ci-dessus on obtient (figure 18) :

$$k_T = 4,6 \pm 0,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_d = 0,9 \pm 0,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \quad \text{soit } t_{1/2} = 7,7 \mu\text{s}$$

$$\epsilon(\text{Car}^*, 555 \text{ nm}, \text{CS}_2) = 62\,000$$

Dans un article précédent [124] nous avons donné une valeur trop faible pour k_d ($6,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$). Pour le calcul de T nous avons encore supposé une différence de 15 000 entre

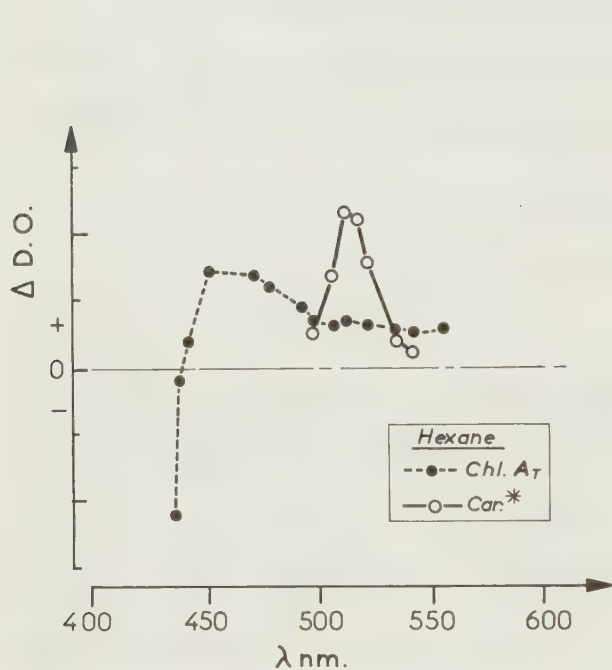
les coefficients d'extinction de Chl A et Chl A_T à 555 nm.

Les xanthophylles étudiées (zéaxanthine, lutéine, isolutéine, violaxanthine) donnent des résultats analogues au carotène.

Avec la lutéine dans le CCl₄ nous avons obtenu :

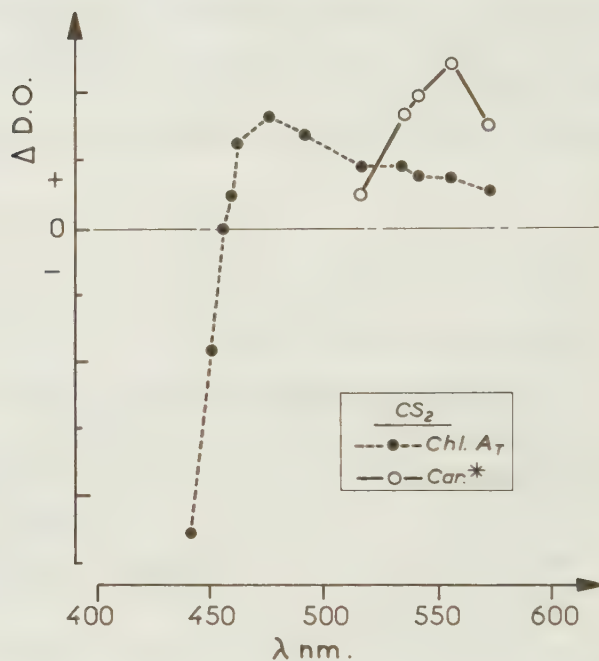
$$k_T = 6,10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad k_d = 1,5.10^5 \text{ s}^{-1} \quad \text{soit } t_{1/2} = 5,6 \text{ } \mu\text{s}$$

$$\epsilon (\text{Lutéine}^*, 511 \text{ nm, CCl}_4) \sim 140\,000$$



- Figure 15 -

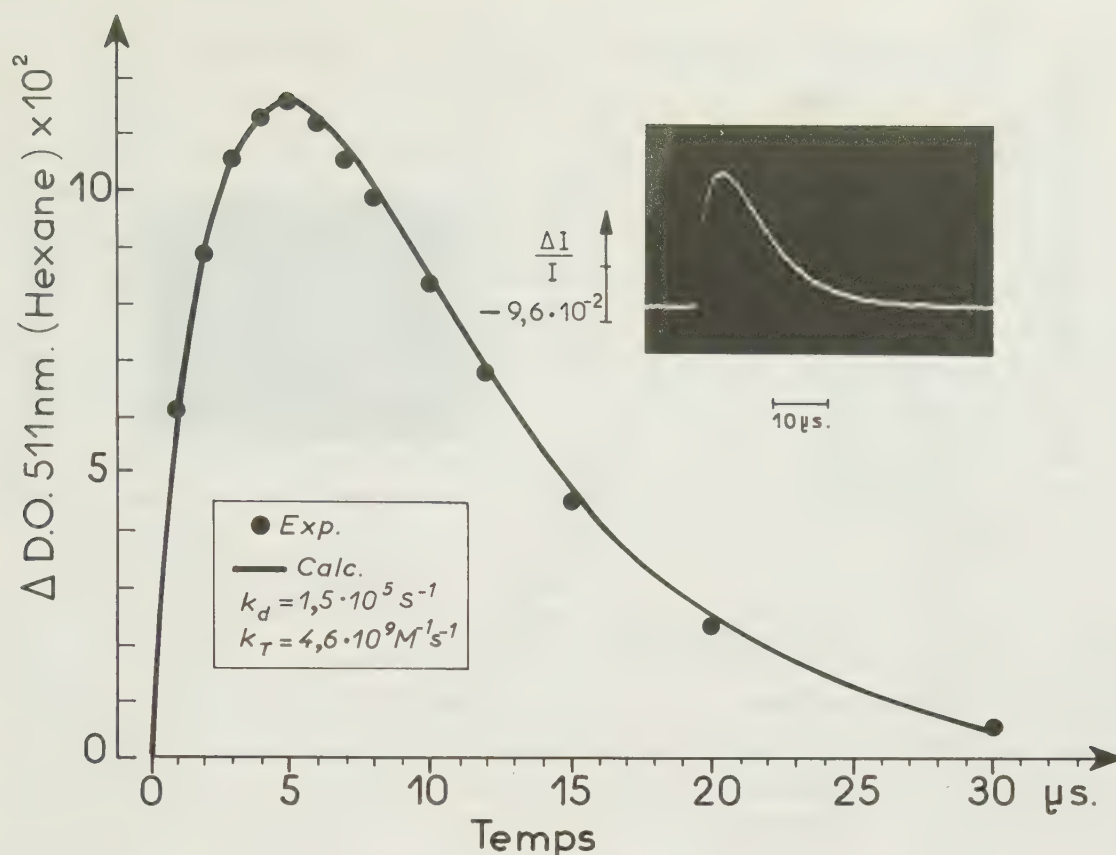
Chlorophylle A et carotène dans l'hexane
+ 5 % d'acétone



- Figure 16 -

Chlorophylle A et carotène dans le CS₂

Figures 15 et 16 : Spectres de différence obtenus par excitation laser de solutions dégazées. En ordonnée : ΔDO en valeur relative (les amplitudes des variations dues à Chl A_T et à Car* ne sont pas comparables). Δλ = 6 nm.



- Figure 17 -

Oscillogramme : augmentation de DO transitoire suivant l'excitation laser d'une solution dégazée, dans l'hexane + 5 % d'acétone, de Chl A $2 \cdot 10^{-5} M$ et de carotène $5,9 \cdot 10^{-5} M$. L'acétone a été ajouté pour s'assurer que toute la Chl A est sous forme monomère.

$\lambda = 511 \text{ nm} - \Delta\lambda = 6 \text{ nm} - R_c = 0,5 \text{ k}\Omega$.

Courbes : les points représentent les mesures de ΔDO sur l'oscillogramme. La courbe continue représente l'approximation faite de la courbe expérimentale en ajustant k_d et k_T .

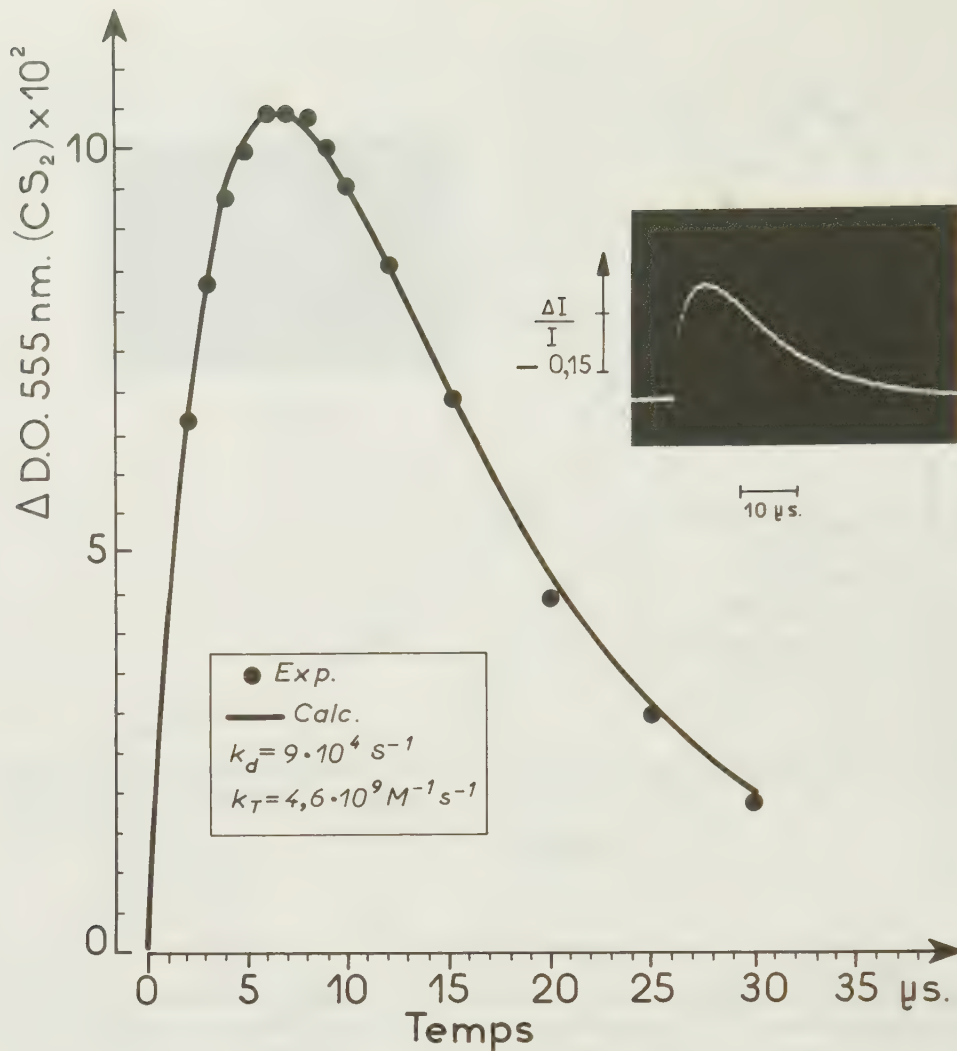
C-2-3 Discussion

La réaction de la chlorophylle A à l'état triplet avec les caroténoïdes redonne immédiatement l'état fondamental de la chlorophylle ; il ne s'agit donc pas de la formation d'un complexe, du type transfert de charge par exemple, ni d'une réaction photochimique réversible. Car* étant formé à partir de Chl A_T, l'explication la plus simple est que Car* $\equiv$ ³Car, état triplet d'un caroténoïde. C'est l'interprétation qu'ont donnée CHESSIN et coll [25] de l'augmentation d'absorption transitoire qu'ils ont observée par réaction du carotène avec les états triplets de la chlorophylle A, de l'anthracène, du tétracène et du benzanthracène.

Dans cette interprétation le résultat le plus surprenant nous semble être l'effet de solvant que nous observons. Pour le carotène, k_T est bien le même dans l'hexane et dans le CS₂, mais on observe entre ces deux solvants :

- une différence de position du maximum de DO de ³Car (511 nm dans l'hexane 555 nm dans le CS₂) qui suit à peu près le déplacement de la bande d'absorption de l'état fondamental du carotène dans ces deux solvants.

- k_d passe de $1,5 \cdot 10^4 s^{-1}$ dans l'hexane à $0,9 \cdot 10^4 s^{-1}$ dans le CS₂. Cette différence est trop importante pour pouvoir être due à une impureté.



- Figure 18 -

Oscillogramme : augmentation de DO transitoire suivant l'excitation laser d'une solution dégazée, dans le CS_2 , de Chl A $1,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ et de carotène $5,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

$$\lambda = 555 \text{ nm} - \Delta\lambda = 6 \text{ nm} - R_c = 0,5 \text{ k}\Omega$$

Courbes : les points représentent les mesures de ΔDO sur l'oscillogramme, diminuées de la ΔDO due à Chl A_T. La courbe continue représente l'approximation de la courbe expérimentale en ajustant k_d et k_T .

- le coefficient d'extinction de ^3Car , au maximum, passe de 191 000 dans l'hexane à 62 000 dans le CS_2 . Cette différence semble aller de pair avec une différence dans la largeur de la bande d'absorption de ^3Car , qui est au moins deux fois plus large dans le CS_2 que dans l'hexane (figure 15, 16). La différence entre les coefficients d'extinction ne peut être attribuée à la présence, dans le CS_2 , d'une impureté qui désactiverait ^3Car (k_d est plus faible dans le CS_2 que dans l'hexane) ou qui désactiverait Chl A_T (k_T a la même valeur dans les deux solvants).

L'état métastable formé dans les chloroplastes (paragraphe C-1) a des propriétés très voisines de celles de ^3Car . Pour voir plus précisément s'il s'agissait du même état nous avons étudié un système modèle où la situation des pigments est, à certains égards, plus semblable à leur situation in vivo : des micelles de détergent.

C-3 Chlorophylle A et lutéine dans des micelles de digitonine

TEALE et WEBER ont montré qu'un transfert d'énergie a lieu entre caroténoïdes et chlorophylle A inclus dans des micelles de détergents [162] [163], reproduisant des résultats connus dans les structures photosynthétiques : la fluorescence de la chlorophylle A est sensibilisée par les caroténoïdes. Les résultats obtenus dans les micelles de détergents impliquent une étroite proximité des molécules de pigments ; nous avons pensé que ce système serait commode pour l'étude d'un phénomène en sens inverse : transfert d'énergie triplet de la chlorophylle A aux caroténoïdes, en milieu quasi-solide, et non plus en solution où les réactions sont limitées par la diffusion.

Pour ce travail nous avons choisi la lutéine, xanthophylle la plus courante, au lieu du carotène, qui n'est pas dissous par le détergent utilisé : la digitonine.

C-3-1 Digitonine. Micelles

La digitonine est un détergent non-ionique qui a été beaucoup utilisé pour le fractionnement des systèmes pigmentaires biologiques, bâtonnets rétiens et chloroplastes [82] [186]. En solution aqueuse elle forme des micelles dont une structure possible est représentée sur la figure 19. Des études par ultracentrifugation et diffusion de la lumière ont montré que ces micelles étaient assez homogènes en taille (environ 75 molécules de monomère) [159]. Les micelles peuvent s'associer en supermicelles qui précipitent. On a un équilibre entre la forme micellaire et la forme monomère, équilibre qui ne répond pas à la loi normale : il y a formation de micelles brutalement, au-delà d'une concentration appelée CMC, concentration micellaire critique. Nous n'avons pas trouvé la valeur de la CMC de la digitonine ; elle est inférieure à 0,5 % en poids, soit $4.10^{-3}M$.

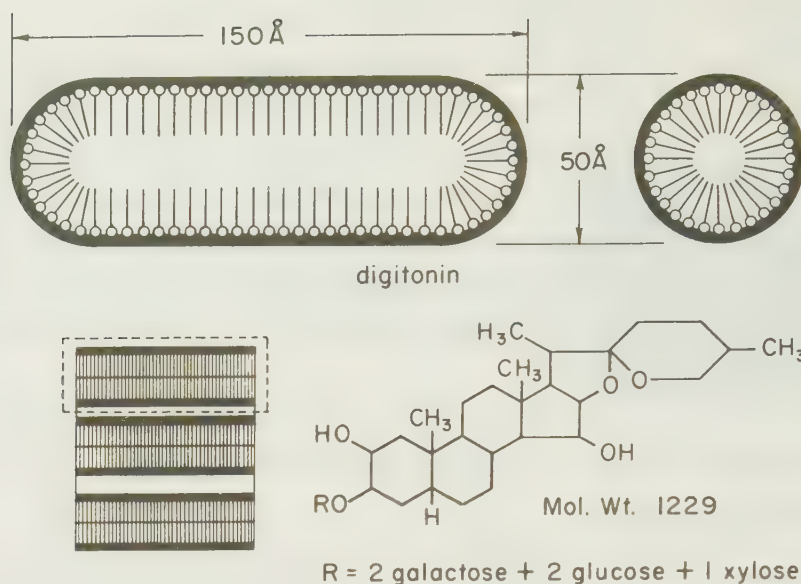
Le caractère essentiel des détergents est de posséder un site polaire qui permet des interactions électrostatiques et confère la solubilité dans l'eau, ainsi qu'une queue hydrophobe qui permet la constitution des micelles stabilisées essentiellement par des liaisons hydrophobes [132]. C'est la constitution de ces zones hydrophobes qui permet la solubilisation d'hydrocarbures insolubles dans l'eau. Toutefois les détergents solubilisent beaucoup mieux les molécules qui possèdent elles-mêmes un site polaire et une partie hydrophobe. C'est sans doute ce qui explique la différence de solubilité entre le carotène et la lutéine.

La préparation des micelles de digitonine et l'incorporation des pigments ont été décrites au paragraphe B-2-4.

C-3-2 Description des variations d'absorption suivant l'excitation laser

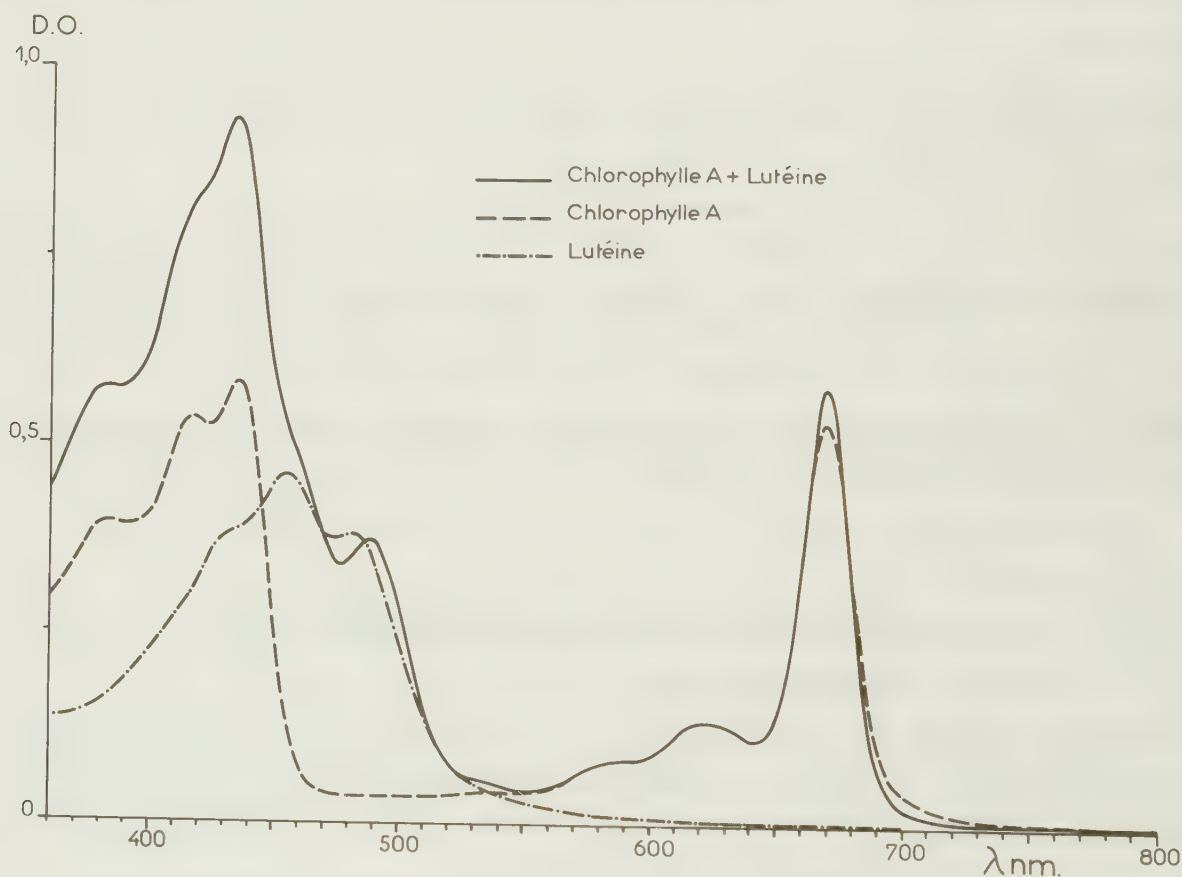
C-3-2-1 Chlorophylle A seule

Le spectre d'absorption de la chlorophylle A, dans les micelles de digitonine (figure 20) ressemble beaucoup au spectre dans l'éthanol ou le méthanol, avec en outre un élargissement de la bande d'absorption de grande longueur d'onde, vers 710 nm, que nous attribuons à des agrégats de chlorophylle A (cf. Annexe 2).



- Figure 19 -

Structure hypothétique d'une micelle de digitonine (d'après WOLKEN [186]). Les deux hydroxyles sont situés en arrière du plan.



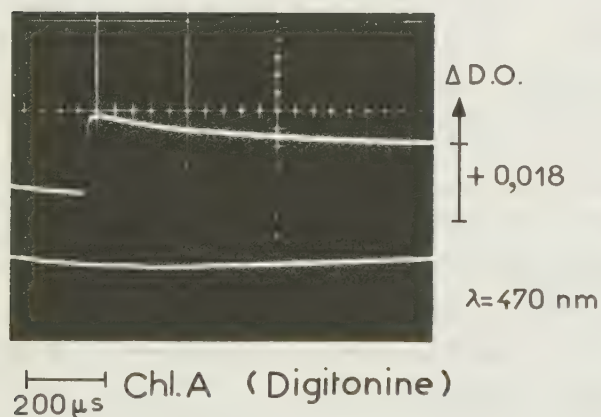
- Figure 20 -

Spectres d'absorption des pigments dans des micelles de digitonine
Chlorophylle A seule ($7,5 \cdot 10^{-6}M$) ; lutéine seule ($5,4 \cdot 10^{-6}M$) ;
Chlorophylle A ($7,5 \cdot 10^{-6}M$) + lutéine ($4,8 \cdot 10^{-6}M$)

L'excitation, avec l'impulsion laser rouge, de ces solutions préalablement dégazées, produit une augmentation transitoire d'absorption (figure 21) qui peut être attribuée à Chl A_T. La décroissance se fait suivant une loi exponentielle avec $k_c = 640 \text{ s}^{-1}$, soit un peu moins que ce qu'on trouve souvent dans les solvants organiques (LINSCHITZ et SARKANEN donnent 670 s^{-1} pour Chl A_T dans la pyridine [109]. Nous n'avons pas observé de composante du second ordre. Le spectre de différence, normal pour Chl A_T, est représenté sur la figure 22.

En présence de teneurs croissantes en oxygène, on peut noter que la variation de DO initiale ne change pas, et que la durée de vie diminue. On peut mesurer une constante de vitesse de la réaction bimoléculaire de désactivation :

$k(\text{Chl A}_T, \text{O}_2) = 2,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Cette valeur est très faible ; en effet cette constante de vitesse est généralement 4 fois plus faible que k_{diff} , ce qui, dans l'eau, donnerait $1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La différence ne peut pas être attribuée à une augmentation de la viscosité macroscopique par la digitonine ; celle-ci est de 1,1 cpoise pour une solution à 1,8 % de digitonine. On peut envisager deux explications : ou bien la chlorophylle est située dans une zone difficilement accessible (intérieur des micelles), ou bien elle est située dans un volume où la concentration en O_2 est nettement plus faible que dans l'eau (coefficient de Henry petit).



- Figure 21 -

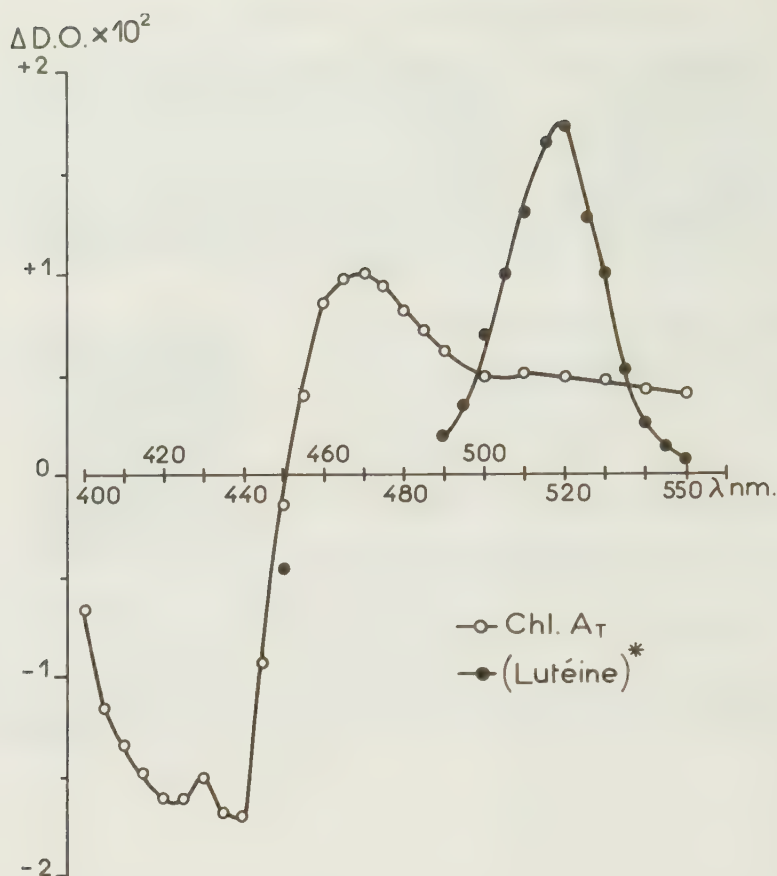
Augmentation de DO obtenue par excitation laser d'une solution ($1,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) de Chl A dans la digitonine. Solution dégazée. $R_c = 26 \text{ k}\Omega$

C-3-2-2 Lutéine seule

La lutéine seule est mal incorporée par la digitonine. Le spectre de la suspension (limpide) obtenue (figure 20) présente des pics mal définis. Par excitation laser on n'obtient aucun état transitoire décelable par notre technique.

C-3-2-3 Chlorophylle A + Lutéine

Le spectre de la suspension (figure 20) présente quelques différences avec le spectre résultant de la somme des constituants séparés. On observe un affinement de la bande rouge de la Chl A, ce que l'on peut attribuer à une disparition d'agrégats. De même le pic de la lutéine, à 489 nm, est mieux défini. Les suspensions utilisées ont des concentrations en Chl A de l'ordre de 10^{-5} M et des rapports chlorophylle/lutéine variant entre 1 et 5.



- Figure 22 -

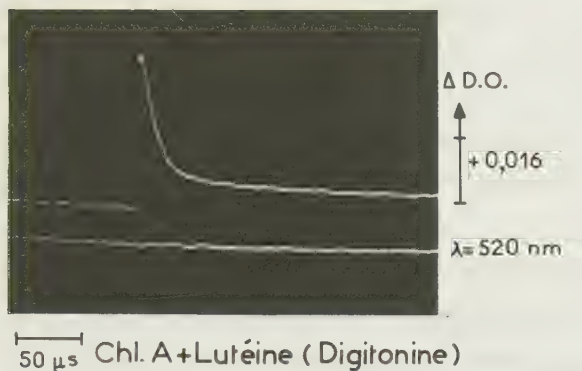
Spectre de différence. Pigments dans la digitonine. Chl A_T : phase lente attribuée au système Chl A - Chl A_T. (Lutéine)* : phase rapide obtenue avec le mélange Chl A + lutéine. $\Delta\lambda = 6 \text{ nm}$.

Par excitation, avec l'impulsion laser rouge, d'une solution dégazée, on obtient des signaux complexes (figures 23, 24) comportant deux phases du premier ordre, dont l'importance relative varie avec le rapport chlorophylle/lutéine :

- phase à décroissance lente ($k_1 < 4.10^3 \text{ s}^{-1}$) dont le spectre de différence correspond au peuplement de l'état triplet de la chlorophylle (figure 22).

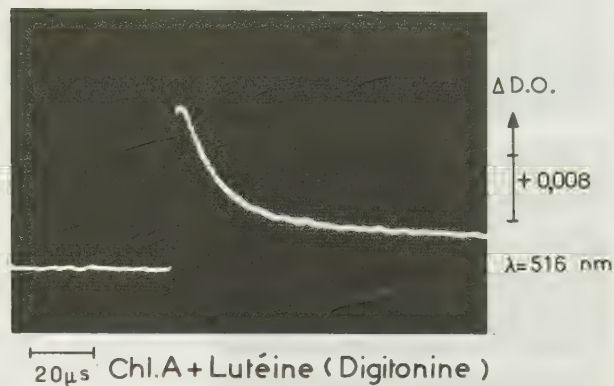
- phase à décroissance rapide ($k_2 = 7,8.10^4 \text{ s}^{-1}$) dont le spectre de différence présente une augmentation maximale vers 518 nm, et une diminution vers 450 nm (figure 22). Cette diminution n'est observable correctement qu'au point où la variation due à Chl A_T est nulle (figure 25). Nous appellerons Lut* l'état de courte durée ($t_{1/2} \sim 9 \mu\text{s}$), pour signifier qu'il est lié à la présence de lutéine. Dans tous les cas la réaction qui produit Lut* est très rapide : moins de $0,5 \mu\text{s}$, même à 77 °K.

En présence de teneurs croissantes en oxygène on trouve que la variation de DO initiale ne change pas, et que la durée de vie de l'espèce Lut* diminue. Il est possible d'effectuer des mesures quantitatives à 516 nm, avec un rapport Chl A/lutéine = 1 ; dans ces conditions l'amplitude de la phase rapide est prédominante ; sinon on observe l'effet de l'oxygène simultanément sur les deux phases de la décroissance, ce qui complique l'interprétation.



- Figure 23 -

Variation de D_0 à 520 nm d'une suspension de micelles de digitonine contenant de la chlorophylle A ($15 \cdot 10^{-6}$ M) et de la lutéine ($10 \cdot 10^{-6}$ M), excitée par l'éclair laser. Solution dégazée. $\Delta \lambda = 6$ nm $R_c = 4$ k Ω



- Figure 24 -

Variation de D_0 , à 516 nm d'une suspension de micelles de digitonine contenant de la Chl A ($8 \cdot 10^{-6}$ M) et de la lutéine ($5 \cdot 10^{-6}$ M), excitée par l'éclair laser. Solution dégazée. $\Delta \lambda = 10$ nm $R_c = 2$ k Ω

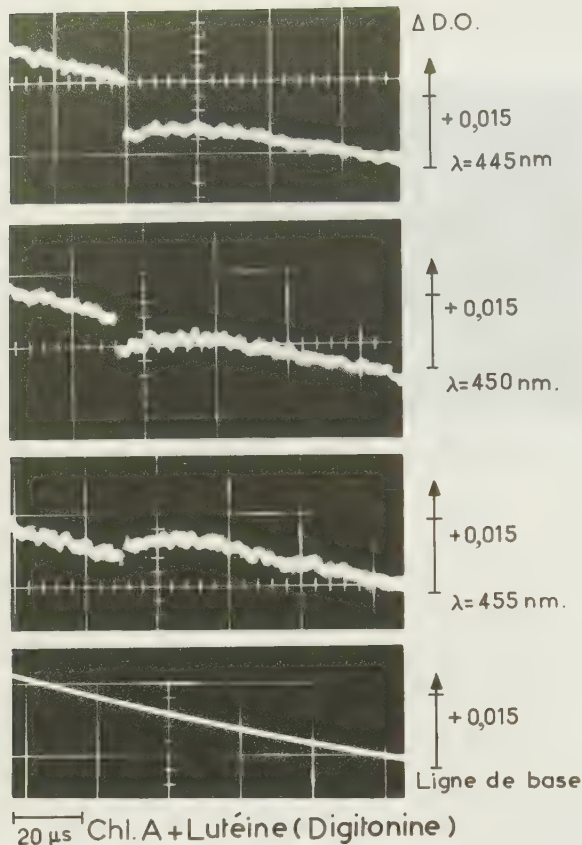
Nous avons mesuré la constante de vitesse de la réaction bimoléculaire de désexcitation :

$k(\text{Lut}^*, 0_2) = 7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Comme pour la chlorophylle cette valeur a été obtenue en prenant comme constante de Henry celle de l'eau distillée.

En l'absence d'oxygène, la température a peu d'effet sur les variations de D_0 de Lut^* . Voici par exemple une série de résultats (à 516 nm) :

T (°K)	293	258	228	77
$\Delta D_0 \times 10^2$	1,5			2,0
$t_{1/2} \mu \text{s} (\pm 0,5)$	8,9	9,0	10,4	11,0

L'augmentation de ΔD_0 peut être due, pour une part, à l'augmentation de concentration par contraction.



- Figure 25 -

Variation de DO, à trois longueurs d'onde différentes, d'une suspension de micelles de digitonine contenant de la chlorophylle A ($15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) et de la lutéine ($8,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), excitée par l'éclair laser. Cuve dégazée $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$. $R_c = 1 \text{ k}\Omega$.

On voit la superposition d'une diminution de DO à cinétique rapide (Lut*) et d'une variation à cinétique lente (Chl A_T) qui est négative (445 nm), nulle (450 nm) ou positive (455 nm).

C-3-3 Discussion

Nous interprétons les résultats par une réaction analogue à celle que l'on observe en solution :



On peut pratiquement éliminer l'hypothèse suivant laquelle le signal rapide serait dû à la formation, après excitation, d'un complexe Chl A-Lut, car il n'y a pas de ΔDO rapide à 658 nm, dans la bande d'absorption de la Chl A.

De même on peut éliminer l'hypothèse d'une forme radicalaire de la lutéine à cause de l'absence d'effet de la température. Avec la Chl A et la lutéine dans le CCl_4 , nous avons trouvé une absorption transitoire maximale à 512 nm (paragraphe C2-2) : la différence avec la longueur d'onde trouvée ici (518 nm) entre dans le champ des effets de solvants. La désactivation par O_2 est en bon accord avec l'attribution à un état triplet. Toutefois il semble étonnant que k_{O_2} soit plus faible pour Chl A_T ($2,4 \cdot 10^8$) que pour ${}^3\text{Lut}$ ($7 \cdot 10^8$) alors que le transfert d'énergie $\text{Chl A}_T \rightarrow {}^3\text{Lut}$ implique un niveau d'énergie plus bas pour ${}^3\text{Lut}$ que

pour Chl A_T . Comme les micelles constituent un milieu hétérogène, il est possible que les molécules de lutéine soient beaucoup plus accessibles à l'oxygène que les molécules de chlorophylle.

La rapidité du transfert, même à basse température, exclut une diffusion des molécules, tandis que la forme des courbes de décroissance de ΔDO semble incompatible avec une distribution au hasard des molécules ; sinon la longue durée de vie de Chl A_T permettrait un transfert pendant un temps très long, pour des dispositions spatiales des molécules considérées peu favorables au transfert. Pour interpréter les signaux en deux exponentielles (Chl A_T et ^3Lut) nous devons admettre un arrangement spatial des molécules de Chl A et de lutéine tel que le transfert se fasse quasi-instantanément ou pas du tout ; il y aurait deux classes de Chl A_T :

- des molécules qui transfèrent rapidement leur énergie à la lutéine,
- des molécules qui ne transfèrent pas du tout.

Une telle séparation est rendue possible par le cloisonnement des pigments par les micelles. Il suffit d'admettre que le transfert intramicellaire est très rapide, ce qui n'est pas déraisonnable compte-rendu de leurs dimensions (figure 19) ; il faut aussi admettre que le transfert intermicellaire est impossible, ce qui est tout à fait logique compte-tenu de leur faible concentration, de l'ordre de 0,04 % en poids lors des mesures de ΔDO (on peut calculer que la distance moyenne entre micelles voisines est de l'ordre de 600 Å).

Toutefois un tel schéma laisse supposer que le signal de Chl A_T (signal lent) doit diminuer si l'on augmente la concentration en lutéine ; c'est le contraire qui se passe. Cette contradiction nous a amené à considérer une troisième classe de molécules de chlorophylle : les agrégats, et à voir l'influence de la lutéine sur ces agrégats. Cette étude, quoique n'entrant pas en ligne directe dans le problème des états métastables des caroténoïdes, est rendue indispensable par la non-observation de la désexcitation de Chl A_T par la lutéine dans les micelles. Elle est décrite dans l'annexe 2. Nous en donnons ici succinctement le résultat : la lutéine favorise la dispersion des agrégats de chlorophylle dans les micelles de digitonine, ce qui augmente la proportion de molécules de Chl A sous forme monomère et donc la formation initiale de Chl A_T , en spectroscopie d'éclairs (au sein des agrégats l'énergie est dissipée rapidement et on n'observe pas de formation de Chl A_T). Le fait que l'on n'observe pas de quenching de Chl A_T par la lutéine n'est pas incompatible avec l'hypothèse d'un transfert triplet-triplet Chl $A_T \rightarrow ^3\text{Lut}$.

C-4 Comparaison des résultats obtenus avec les chloroplastes, avec les pigments en solution et avec les pigments dans des micelles

Pour faire le point des trois systèmes étudiés, on peut tirer les conclusions suivantes :

- les expériences en solution indiquent clairement un transfert d'énergie triplet-triplet de la chlorophylle A à divers caroténoïdes.
- les expériences effectuées avec la digitonine mettent en évidence, par excitation de la chlorophylle A, un état transitoire auquel participe la lutéine et dont les propriétés sont très voisines de celles de ^3Lut obtenue en solution ($t_{1/2}$, spectre d'absorption). Il est raisonnable d'admettre qu'on a, là aussi, un transfert d'énergie triplet-triplet de la chloro-

phylle A à la lutéine, avec la différence que le milieu condensé donne la possibilité d'un transfert très rapide.

- les expériences effectuées sur les chloroplastes mettent en évidence, par excitation de la chlorophylle, un état transitoire qui a les propriétés des caroténoïdes triplets (désactivation par l'oxygène, spectre d'absorption, temps de vie, même absence d'effet de la température). Toutefois le milieu est complexe et il n'est pas possible de tirer de conclusions définitives. Il nous semble raisonnable d'admettre que l'on a, là aussi, un transfert de la chlorophylle triplet aux caroténoïdes, transfert très rapide comme dans les micelles.

Nous allons exposer maintenant un certain nombre d'expériences, qui sont cohérentes avec ces conclusions, et qui apportent quelques précisions sur le transfert et sur certaines propriétés de l'état triplet des caroténoïdes.

C-5 Etat triplet des caroténoïdes. Expériences diverses

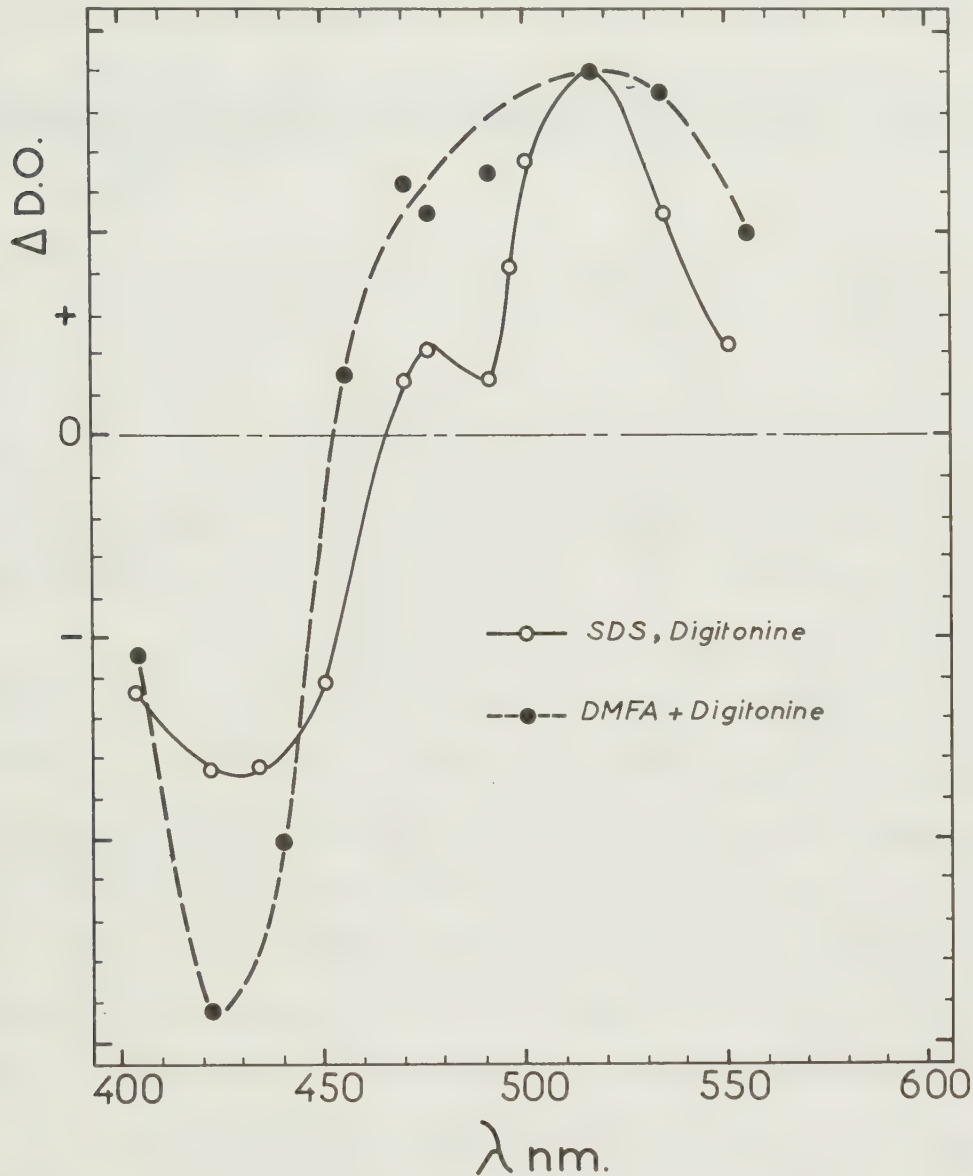
C-5-1 Modifications de la structure du chloroplaste

Dans l'interprétation que nous donnons des signaux de variation d'absorption de chloroplastes, la structure de ces derniers permet un transfert rapide $\text{Chl } A_T \rightarrow {}^3\text{Car}$. A la limite, avec les mêmes concentrations de pigments en solution les transferts seraient très lents. On peut aussi penser trouver des structures modifiées, où, comme dans les micelles, certaines molécules de $\text{Chl } A_T$ peuvent transférer leur énergie et d'autres pas. Rappelons d'abord que des traitements qui n'altèrent pas la structure au niveau pigmentaire ne changent pas le transfert triplet : séjour dans l'eau distillée, cassage aux sons ou à la presse de French, séjour de l'ordre de la journée dans du glycérol à température ambiante, lyophilisation, etc... Ces traitements ne changent pas non plus les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire.

Traitements par les détergents. Des chloroplastes d'épinard ont été traités par le dodécylsulfate de sodium ou SDS (traitement 15 minutes avec une solution à 0,2 % de SDS dans un tampon phosphate 0,02 M, pH 7,8 - puis dilution avec le tampon et centrifugation 1^H à 20 000 g - on utilise le surnageant), ou par la digitonine (solution à 1 %, même préparation). Les deux détergents donnent le même résultat en spectroscopie par éclairs. Le spectre de différence (figure 26) est modifié d'une façon caractéristique : vers 480 nm on a une augmentation de DO alors que les chloroplastes non traités donnent une diminution de DO. Toutefois l'amplitude relative des pics varie d'une préparation à l'autre d'environ 50 %. Cette variabilité peut s'expliquer par l'hétérogénéité et l'évolution au cours du temps du matériel obtenu par traitement aux détergents [11]. L'analyse des signaux montre que la décroissance n'est plus exponentielle, mais elle n'est pas non plus clairement biphasique.

Pour des chloroplastes préalablement traités à la diméthylformamide (DMFA) à 70 % ce qui enlève la majeure partie des caroténoïdes, on obtient un spectre de différence (figure 26) qui ressemble beaucoup au spectre obtenu par ZIEGLER et WITT [190] pour l'état triplet d'un mélange $\text{Chl } A + B$. De plus, le temps de vie est nettement allongé en l'absence d'oxygène : $t_{1/2} = 25 \mu s$ (sous un vide de 10^{-1} torr). Pour les chloroplastes traités par les détergents le spectre de différence est donc intermédiaire entre celui de l'état triplet de caroténoïdes (figure 10) et celui de l'état triplet des chlorophylles (figure 26).

Les détergents fractionnent la structure du chloroplaste ; tout se passe comme si la suspension obtenue était hétérogène et comprenait des fragments au sein desquels il y a transfert $\text{Chl } A_T \rightarrow {}^3\text{Car}$, et des fragments où ce transfert est impossible.



- Figure 26 -

Spectres de différence obtenus par excitation laser de suspensions de chloroplastes traités par le SDS, par la digitonine, et par la diméthylformamide (DMFA) puis la digitonine. En ordonnée : valeurs relatives. Mesures effectuées sous air. $\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$.

Un effet analogue est obtenu en traitant des chloroplastes lyophilisés avec de l'heptane, puis par un mélange heptane-acétone (jusque 15 %). Ces traitements enlèvent d'abord le carotène et les lipides, puis les chlorophylles et les xanthophylles (entre autres). Pour une même absorption de la lumière laser (même DO à 694 nm) ces traitements affectent peu l'amplitude de la variation de DO vers 511 nm, qui devient progressivement biphasique. En même temps le spectre de différence est progressivement modifié : la variation de DO vers 480 nm devient positive et croît à mesure qu'augmente le nombre de traitements.

Sous vide on a $t_{1/2}$ (480 nm) > 20 μ s. Nous donnerons de ces résultats la même interprétation en disant que, au sein de la structure partiellement désorganisée, le transfert triplet-triplet aux caroténoïdes est impossible pour certaines molécules de chlorophylle. De plus, comme les premiers traitements à l'heptane enlèvent essentiellement le carotène et qu'ils se révèlent être sans effet sur la formation de ^3Car , ces résultats peuvent indiquer que les xanthophylles, plus que le carotène, acceptent l'énergie de Chl A_T in vivo. Pour décrire quantitativement les phénomènes il faudrait tenir compte de la suppression du transfert singulet entre chlorophylles, et donc de l'augmentation de la probabilité de passage à l'état triplet.

C-5-2 Interprétation de la courbe $[^3\text{Car}] = f(\text{énergie laser})$, dans des chloroplastes.

On a vu au paragraphe C-1-4 que le rendement de formation de ^3Car était faible, de l'ordre de 1 à 2 %, aux plus faibles énergies laser utilisées. Ce résultat est logique puisque la chlorophylle a elle-même un faible rendement de fluorescence, de l'ordre de 2 % : on peut supposer que la probabilité de désexcitation de la chlorophylle, dans son état singulet excité, en fluorescence ou en états triplets est la même qu'en solution (soit un photon émis pour deux triplets formés [13]). Toutefois aux fortes excitations des chloroplastes le rendement de fluorescence augmente [56] ; on devrait donc avoir une augmentation de rendement de formation de ^3Car . En fait on observe une diminution (figure 12).

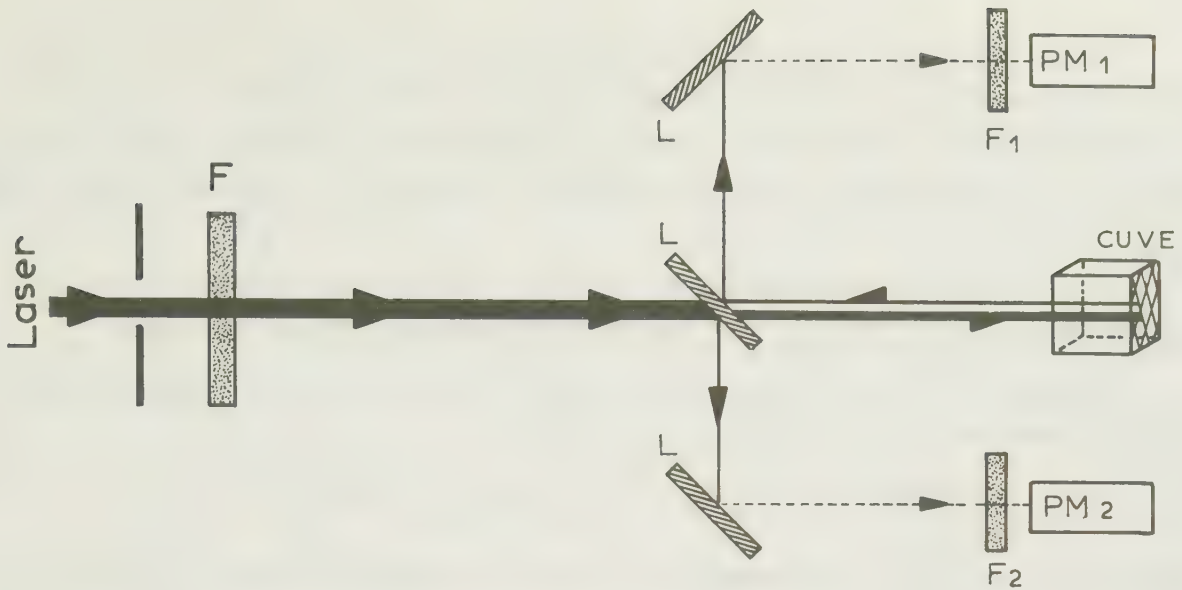
La courbe de la figure 12 ne peut pas être expliquée par une saturation de l'absorption de la chlorophylle à 694 nm. Ce point a été vérifié avec le montage de la figure 27. Le photomultiplicateur PM_1 reçoit une impulsion de lumière ayant traversé deux fois la cuve ; le signal de PM_2 est proportionnel au signal laser après traversée de filtres variables. Sans entrer dans les détails disons que, en remplissant la cuve de la suspension de chloroplastes dans le glycérol, ou de glycérol seul ou d'une solution de sulfate de cuivre (pour avoir la réflexion sur la face avant de la cuve), on peut constater que la DO de la cuve, à 6943 Å, pour différentes énergies laser, est constante jusque vers 250 mJ. Aux plus fortes énergies les mesures sont faussées par une absorption due à un effet non linéaire sur le glycérol.

On peut envisager deux hypothèses pour rendre compte de la tendance à la saturation :

- a) Seulement un petit nombre de molécules de caroténoïdes peuvent passer à l'état triplet. On aurait à peu près $[\text{Chl A}] = 44 [^3\text{Car}]_{\text{max}}$, soit $[^3\text{Car}]_{\text{max}} \sim \frac{1}{44} [\text{Car}]$ (cf. paragraphe C-1-4)

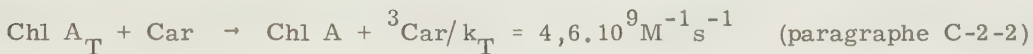
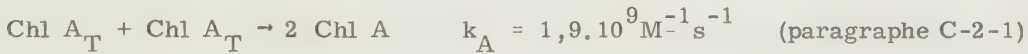
On ne peut pas exclure cette hypothèse, qui toutefois rend mal compte de la courbe (figure 12) ; on s'attendrait à une vraie saturation.

- b) Il y a plusieurs phénomènes en compétition. On peut particulièrement envisager un transfert d'excitation triplet entre molécules de chlorophylle, avec annihilation triplet-triplet. Ce mécanisme est possible comme l'a suggéré ROBINSON sur des bases théoriques [146] ; il serait prédominant aux fortes excitations. Par analogie, voyons ce que donne, en solution, une compétition entre les deux réactions suivantes :



- Figure 27 -

Montage destiné à mesurer la DO d'une suspension de chloroplastes, à $6943 \text{ \AA}$, sous irradiation laser d'intensité variable. F : filtre gris variable. L : lame de verre. F_1, F_2 : filtres linéaires. Les PM sont montés en intégrateurs pour l'impulsion laser. F, F_1 , F_2 : filtres Schott, type NG.



Supposons alors que l'éclair laser est court vis à vis de ces réactions, soit à $t = 0$ un peuplement maximal en $\text{Chl } A_T$. Posons :

$$T = [\text{Chl } A_T]_0 \quad C = [\text{Car}] \sim \text{constante} \quad y = [\text{Chl } A_T] \quad z = [{}^3\text{Car}]$$

$$\text{on a : } \frac{dy}{dt} = - (k_A y^2 + k_T C y)$$

d'où

$$y = \left[\left(\frac{1}{T} + \frac{k_A}{k_T C} \right) e^{k_T C t} - \frac{k_A}{k_T C} \right]^{-1}$$

Si y et C sont suffisamment grands pour que les réactions précédentes soient rapides vis à vis de la désexcitation de ${}^3\text{Car}$ (c'est le cas dans le chloroplaste où les concentrations locales de pigments sont très grandes et où effectivement la formation de ${}^3\text{Car}$ est rapide par rapport à sa désexcitation); on a :

$$z_{\max} = \int_0^\infty k_T C y dt = \frac{k_T C}{k_A} \text{Log} \left(1 + \frac{k_A}{k_T C} T \right)$$

S'il n'y a pas saturation de l'absorption de la $\text{Chl } A$ par le laser, on a approximativement $T \sim E_{\text{laser}}$. La courbe donnant la formation de ${}^3\text{Car}$ en fonction de $u = E_{\text{laser}}$ est donc de la forme $\text{Log}(1+u)$. C'est approximativement ce qu'on observe (figures 12, 14).

Au sein de la structure du chloroplaste les transferts ne peuvent être désordonnés qu'en solution et un traitement rigoureux semble difficile. Toutefois on aperçoit qu'il est possible d'exciter à l'état triplet toutes les molécules de caroténoïdes, avec un rendement qui décroît constamment à cause du rendement croissant de l'annihilation triplet-triplet entre molécules de chlorophylle.

C-5-3 Vitesse du transfert $\text{Chl A}_T \rightarrow {}^3\text{Car}$ dans les chloroplastes et dans des micelles. Observation de Chl A_T dans des structures photosynthétiques normales.

L'hypothèse que nous retenons pour expliquer les variations de DO dans les milieux condensés (chloroplastes et micelles) est la suivante :



Nous avons vu que dans les chloroplastes ces réactions étaient très rapides : moins de 200 ns (0,2 μ s). Avec un système de détection suffisamment rapide on peut espérer détecter Chl A_T , de très courte durée de vie, et aussi mesurer la vitesse de formation de ${}^3\text{Car}$.

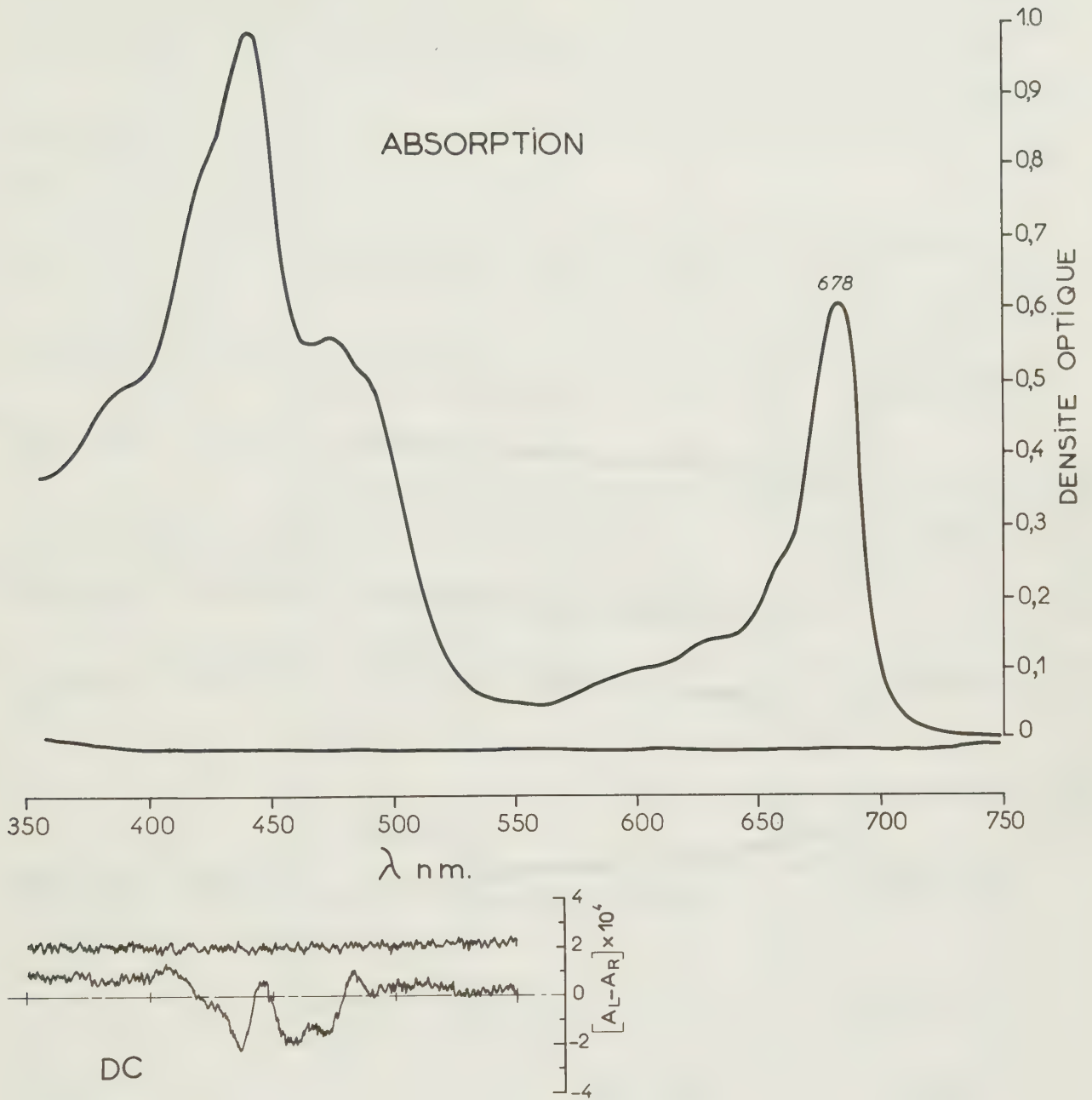
La technique est décrite au paragraphe B. On utilise un tube-éclair comme source de lumière d'analyse. A la sortie du P.M un filtre ne laisse passer que les signaux rapides. Les lamelles chloroplastiques utilisées présentent un spectre d'absorption et un spectre de dichroïsme circulaire normaux (figure 28). Nous avons vérifié que, par excitation laser, la décroissance du signal était exponentielle : il n'y a donc pas formation de Chl A_T de longue durée de vie. A la suspension de lamelles dans l'eau nous avons ajouté $5 \cdot 10^{-4}$ M d'ascorbate de sodium pour éviter les oxydations de caroténoïdes [153], et dans certains cas, du DCMU 10^{-5} M, pour être sûr de bloquer les autres réactions photosynthétiques [182]. En fait il ne semble pas que le DCMU ait d'effet : sur la plan de la biochimie de la photosynthèse, les lamelles ne sont plus fonctionnelles. Dans tous les cas le laser a été atténué par un filtre gris (transmission 31 %) et par un dépoli.

La première étape consiste à étudier de la chlorophylle en solution ; cela permet de connaître le retard introduit par l'appareillage. On regarde la formation de Chl A_T (figure 29 a). Le signal serait quasi-instantané (le temps de vie de l'état singulet excité est très bref : 5 ns) si l'appareillage était parfait. En fait on observe un retard R_1 qui provient de la durée de l'impulsion laser et du temps de montée de l'électronique. Une façon de mesurer R_1 est de mesurer le temps qui s'écoule pour passer de 10 à 90 % de la valeur maximum du signal. R_1 a été mesuré à 511 nm avec de la chlorophylle A dans l'éthanol et dans des micelles de digitonine, et à 440 nm avec un extrait de chloroplastes par l'acétone à 80 %. On obtient la même valeur dans les trois cas :

$$R_1 = 44 \pm 3 \text{ ns}$$

Avec des lamelles, à 511 nm, l'augmentation de DO est plus lente (figure 29 b)

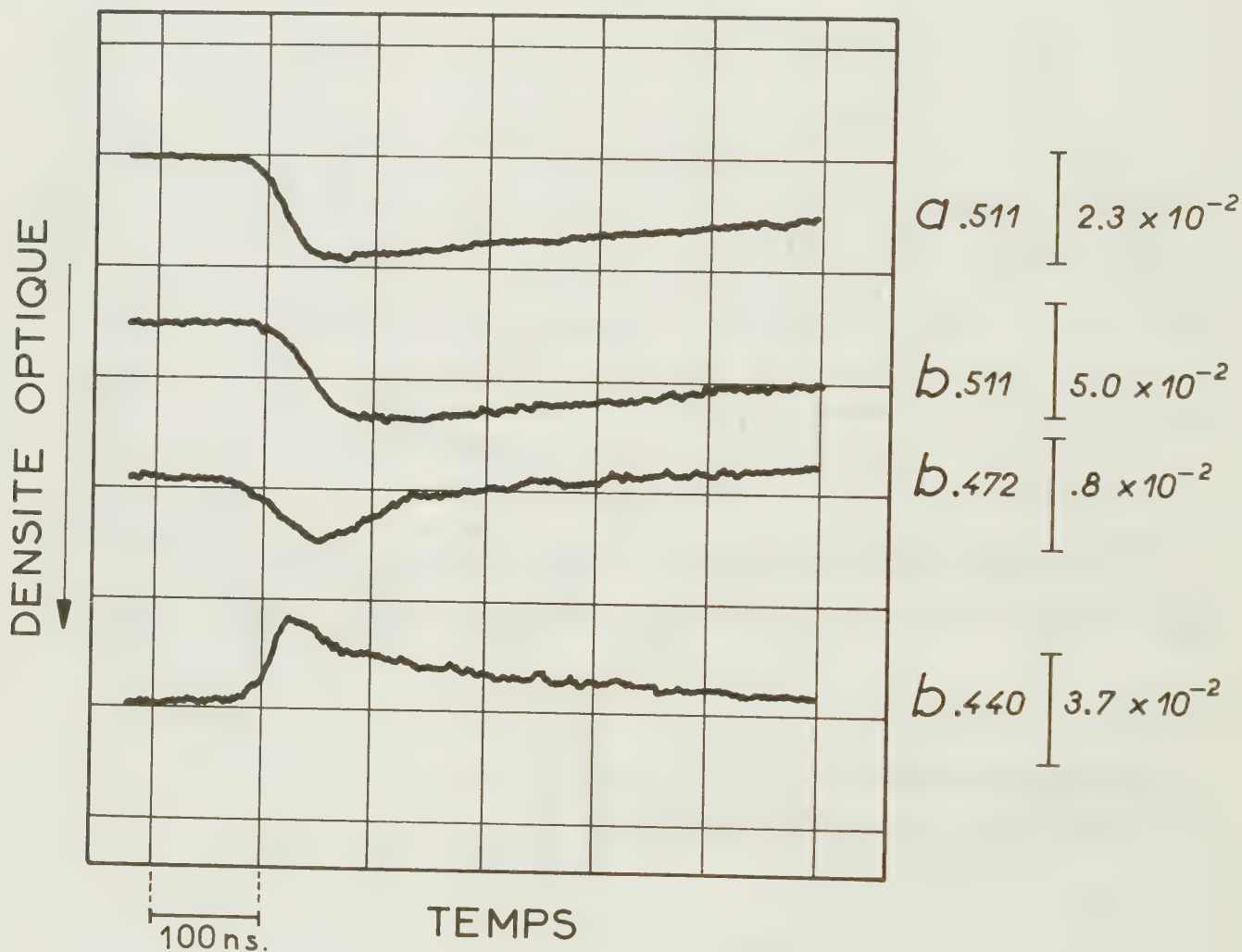
$$R_2 = 64 \pm 3 \text{ ns}$$



- Figure 28 -

Spectre d'absorption (Cary 14) et spectre de dichroïsme circulaire (mesuré au dichrographe Jouan) de lamelles de chloroplastes d'épinards dans l'eau distillée. Même solution pour les deux spectres.

Ce chiffre n'est pas modifié par l'abaissement de la température jusqu'à 77 °K (mesure effectuée dans le cryostat, dans le glycérol à 80 %). En variant la longueur d'onde, on obtient des cinétiques différentes (figure 29 b). A 440 nm on observe une diminution de DO très rapide ($R = 43$ ns), puis un retour biphasique. A 472 nm, par contre, on observe une augmentation de DO rapidement réversible.



- Figure 29 -

Variations de DO mesurées avec un filtre passe-haut. Excitation laser.

a - Chlorophylle A dans l'éthanol

b - Lamelles de chloroplastes d'épinards, dans de l'eau ($+5 \cdot 10^{-4}$ M d'ascorbate ; pH 7)

$\Delta\lambda = 10$ nm. Trajet optique : 1 cm. Concentration en chlorophylle : 10^{-5} M. Energie de l'impulsion laser : ~ 50 mJ.

Ces résultats sont facilement expliqués par l'hypothèse $\text{Chl A}_T \xrightarrow{k_T} \text{Car}_T$. En effet à 472 nm on a $\epsilon(\text{Car}) \sim \epsilon(^3\text{Car})$, et on n'observe que l'augmentation de DO transitoire due à Chl A_T . A 511 nm c'est l'inverse : $\epsilon(^3\text{Car}) \gg \Delta\epsilon \text{Chl A}_T$, et l'on n'observe pratiquement que la formation, légèrement retardée, de ^3Car . A 440 nm on observe les deux phénomènes : diminution de DO rapide due à Chl A_T , puis subsiste la diminution de DO due à ^3Car .

La valeur de k_T est difficile à connaître (on fait l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre). Une approximation grossière consiste à prendre la somme des carrés pour les temps 10 % - 90 % (soit R_T pour le transfert) :

$$R_2^2 = R_T^2 + R_1^2 \quad \text{d'où} \quad R_T = 45 \text{ ns} \quad \text{et} \quad k_T \sim 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$$

On peut aussi utiliser une méthode graphique, à partir des signaux de ΔDO avec la chlorophylle seule ou avec les chloroplastes (à 511 nm). On a approximativement :

$$\begin{aligned} - \text{ avec la Chl A seule} & : \Delta \text{ DO } 511 \text{ nm} \propto [\text{Chl A}_T] = X \\ - \text{ avec les chloroplastes} & : \Delta \text{ DO } 511 \text{ nm} \propto [^3\text{Car}] = Z \end{aligned}$$

Nous ne nous intéresserons qu'aux cinétiques de montée, que l'on suppose non perturbées par la phase de décroissance. L'excitation lumineuse suit une fonction $I(t)$.

- a) Cas idéal (pas de déformation d'appareillage)
- Chlorophylle A seule

On suppose que le passage à l'état triplet se fait en un temps très court. On a alors :

$$\frac{dX}{dt} = a \cdot I(t) \quad \text{et} \quad X(t) = a \int_0^t I(t_1) \cdot dt_1$$

- Chloroplastes

Le transfert $\text{Chl A}_T \longrightarrow ^3\text{Car}$ se fait avec une constante de vitesse k_T . Soit C la concentration en Chl A_T dans ce cas. On a deux relations :

$$\begin{aligned} \frac{dZ}{dt} &= k_T C \\ \frac{dC}{dt} &= -k_T C + a \cdot I(t) \end{aligned}$$

d'où l'on tire :

$$X - Z = \frac{1}{k_T} \cdot \frac{dZ}{dt} \quad (A)$$

- b) L'appareillage provoque une déformation de X et Z ; soit $S(t)$ la fonction de déformation. On mesure :

$$\text{au lieu de } X : x = \int_0^t S(t-t_1) \cdot X(t_1) \cdot dt_1 = S * X$$

$$\text{au lieu de } Z : z = \int_0^t S(t-t_1) \cdot Z(t_1) \cdot dt_1 = S * Z$$

Comme $Z(0) = 0$, on a la relation : $S * \frac{dZ}{dt} = \frac{d}{dt} (S * Z)$

L'équation (A) devient :

$$S * X - S * Z = \frac{1}{k_T} * S * \frac{dZ}{dt} = \frac{1}{k_T} \frac{d}{dt} (S * Z)$$

soit :

$$x - z = \frac{1}{k_T} * \frac{dz}{dt}$$

Cette dernière relation montre que k_T peut être obtenu graphiquement à partir des courbes mesurées à 511 nm. Il faut auparavant normer les courbes, soit $x(t \infty) = z(t \infty)$.

Nous avons obtenu : $k_T = 3,5 \pm 1,0 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

Avec des micelles de digitonine contenant lutéine et chlorophylle A, à 511 nm, nous avons trouvé un temps 10 % - 90 % de 85 ns, inchangé également par abaissement de la température à 77 K.

C-5-4 Recherche d'autres propriétés spectroscopiques de ^3Car

Il serait précieux de corroborer par d'autres mesures spectroscopiques les données sur ^3Car obtenues à partir du transfert d'énergie de la chlorophylle. Nous avons cherché dans trois directions : essais d'observation de ^3Car par excitation directe, d'une absorption $T \leftarrow S_0$ avec le carotène, et d'une phosphorescence de caroténoïdes.

- a) Essai d'observation de ^3Car par excitation directe.

L'excitation de caroténoïdes (carotène, lutéine) par l'impulsion rouge du laser n'a pas permis de déceler de variation d'absorption transitoire, ce qui n'est pas surprenant puisque ces pigments n'absorbent pas dans cette zone. Nous avons essayé d'observer ^3Car par excitation directe avec l'impulsion laser après changement de fréquence ($\lambda = 435 \text{ nm}$) ; cette longueur d'onde correspond à la bande d'absorption des caroténoïdes. A chaque expérience deux cuves dégazées étaient comparées successivement ; l'une contenant de la Chl A, l'autre de la lutéine ou du carotène ; les cuves ont la même DO à 435 nm ($\sim 0,8$).

Il n'a été possible d'observer aucune variation d'absorption avec les caroténoïdes seuls :

- pour la lutéine dans l'éthanol, à 516 nm, $\frac{\Delta I}{I} < 0,1 \%$, alors que la chlorophylle A dans l'éther éthylique donne un signal de 1,2 % à 470 nm. Si on prend $\epsilon(^3\text{Lut}, 516) = 140\,000$ et $\Delta\epsilon(\text{Chl A}_T, 470) = 4 \cdot 10^4$ [110], et si l'on admet un rendement de 70 % pour la conversion de la chlorophylle excitée en état triplet [13], on trouve que le rendement de formation de ^3Lut par excitation directe est inférieur à 2 %.

- pour le carotène seul, dans l'hexane, on obtient $\frac{\Delta I}{I} < 0,7 \%$ à 511 nm, alors que le signal de Chl A_T est de 3 %, à 511 nm aussi. On trouve alors que le rendement de passage à l'état triplet est inférieur à 2,5 %.

- b) Essai d'observation d'une absorption $T \leftarrow S_0$ du carotène.

Compte-tenu du transfert $\text{Chl } A_T \longrightarrow {}^3\text{Car}$ on peut situer la transition $T < \longrightarrow S_0$ du carotène au delà de 750 nm. Cette transition est interdite et donc la bande d'absorption très faible. Nous l'avons recherchée en spectrophotométrie d'absorption, avec des solutions très concentrées de carotène.

Les mesures ont été effectuées avec l'accessoire infra-rouge d'un spectrophotomètre Cary 14 équipé pour la mesure de DO de 0, à 0,1. Sur cet accessoire les cuves (échantillon et référence) sont disposées entre la lampe et le monochromateur et sont donc fortement éclairées. Pour éviter une photodestruction du carotène nous avons placé avant chaque cuve un filtre Schott RG2, 3 mm, qui coupe toute la lumière en-dessous de 600 nm. Les mesures ont été effectuées sous air. Les concentrations des solutions ont été mesurées après deux dilutions successives.

Solvants non iodés. Nous avons obtenu les résultats suivants (ϵ est le coefficient d'extinction molaire de la bande recherchée) :

Benzène : Pas d'absorption supérieure à 0,02, entre 700 et 1000 nm, pour une solution de $\text{DO}_{\text{max}} = 285$. Soit :

$$\epsilon (700 \text{ à } 1000 \text{ nm}) < 8$$

Chloroforme : pas d'absorption supérieure à 0,01, entre 700 et 1400 nm, pour une solution de $\text{DO}_{\text{max}} = 2357$. Soit :

$$\epsilon (700 \text{ à } 1400 \text{ nm}) < 0,5$$

Tribromopropane : avec ce solvant on pouvait espérer un effet d'atome lourd. Nous n'avons pas décelé d'absorption supérieure à 0,01 entre 800 et 1400 nm, pour une solution de $\text{DO}_{\text{max}} = 147$. Soit :

$$\epsilon (800 \text{ à } 1400 \text{ nm}) < 7$$

Béta-carotène 15-15' cis dans l'hexane : nous avons fait un essai sur cet isomère synthétique. On trouve :

$$\epsilon (700 \text{ à } 1100 \text{ nm}) < 4$$

Solvants iodés. Nous avons tenté d'utiliser ces solvants pour bénéficier de l'effet d'atome lourd, dû à l'iode, qui augmente la probabilité des transitions avec changement de multiplicité. Un essai avec l'iodure d'éthyle a donné une bande d'absorption importante, croissant rapidement au cours du temps, autour de 1000 nm. Finalement on observe dans la cuve un dépôt noirâtre. On observe la même chose avec de l'hexane + iode, ou du chloroforme + un peu d'alcool iodé.

En solution diluée on voit une évolution comportant en premier lieu la formation d'isomères cis (augmentation de DO à 340 nm et diminution vers 450 [189]). Puis la bande vers 1000 nm apparaît en même temps que disparaît la bande dans le bleu. Cet effet a déjà été étudié, en particulier par LUPINSKY [117] (cf. paragraphe A2). L'apparition de cette bande vers 1000 nm empêche toute observation d'une éventuelle transition $T < \longrightarrow S_0$. En définitive la transition recherchée est :

ou bien située au-delà de 1400 nm (soit $20,7 \text{ kcal.M}^{-1}$ ou 7900 cm^{-1})
ou bien très fortement interdite (facteur d'interdiction $> 2.10^5$).

- c) Essai d'observation de la phosphorescence de caroténoïdes.

Nous avons essayé de détecter une phosphorescence de caroténoïdes, par excitation directe, ou en excitant par l'intermédiaire de la Chl A. Du fait de la possibilité du transfert $\text{Chl A}_T \longrightarrow {}^3\text{Car}$, il fallait rechercher cette émission à une longueur plus grande que celle de la phosphorescence de la Chl A, soit en tout cas au-delà de 750 nm. Cet essai a été effectué avec un spectrofluorimètre construit dans le Service. Le récepteur de lumière est à cathode de type SI, c'est à dire que le rendement quantique est à peu près constant jusque 1000 nm et qu'il ne chute pas trop vite avant 1100 nm.

Le système le plus favorable pour détecter une émission après transfert nous a semblé être les pigments dans la digitonine, à 77 °K. Nous avons préparé des micelles contenant environ 1 lutéine pour 2 Chl A. En spectroscopie d'éclairs, à 77 °K, ces micelles donnent un signal important dû à ${}^3\text{Lut}$. Par contre, en émission, en excitant à 440 nm (annexe 2, figure 57), il n'est pas possible de distinguer, entre 750 et 1100 nm, une contribution de ${}^3\text{Lut}$.

Il a également été impossible de détecter une émission par excitation directe de l'isomère 15-15' cis du carotène, dans un verre éther de pétrole 2-propanol 1, à 77 °K, au delà de 750 nm. Dans les plus courtes longueurs d'onde le spectre obtenu est en accord avec celui qu'ont publié CHAPMAN et coll [21].

Nous n'avons pas essayé de détecter ${}^3\text{Car}$ par RPE. Le temps de vie de cet état est trop court pour qu'on puisse obtenir un peuplement suffisant en spins (il faut au minimum 10^{12} spins).

C - 6 Conclusions

Dans ce chapitre nous avons, jusque maintenant, décrit les expériences que nous avons effectuées, en les interprétant en terme de transfert d'énergie de l'état triplet de la chlorophylle A à divers caroténoïdes. En fait nous avons abordé sous plusieurs aspects un problème auquel plusieurs laboratoires ont apporté des contributions à peu près simultanément.

Tout d'abord il faut citer le groupe de H.T. WITT, qui, le premier, a décelé dans des structures photosynthétiques une augmentation de densité optique vers 515 nm, à cinétique de retour rapide [131] [191]. En fait, ces auteurs, pour des raisons d'appareillage, n'ont pas pu décrire correctement les propriétés de cet état transitoire et l'ont attribué à un état métastable de la chlorophylle A. Dans un dernier article sur la question, WOLFF et WITT donnent des résultats en excellent accord avec les nôtres [185].

C'est LIVINGSTON, qui, le premier, a interprété en termes d'état triplet du carotène une augmentation transitoire d'absorption observée après excitation de divers sensibilisateurs en présence de carotène dans l'hexane [25]. Sur le plan cinétique les résultats de LIVINGSTON ne sont pas convaincants du fait de limitations instrumentales. Toutefois un résultat essentiel a été obtenu en montrant que le spectre de l'état transitoire était le même avec différents sensibilisateurs : anthracène, tétracène, benzanthracène, chlorophylle A ; il s'agit donc bien d'un état caractéristique du carotène. TRUSCOTT, après avoir participé au travail du groupe de LIVINGSTON, a publié le spectre de l'état triplet du lycopène [161]. Il

obtient des valeurs étonnamment élevées à la fois pour le temps de vie du lycopène triplet (50.10^{-6} s) et pour la constante de vitesse de la réaction du lycopène avec divers donneurs triplets ($\sim 1,5.10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ; le résultat le plus intéressant est que le spectre d'absorption du triplet de la forme trans présente une structure du type vibrationnel, tandis que celui de la forme cis n'en présente pas.

Un certain nombre de résultats ont été obtenus dans le laboratoire de B. CHANCE, en particulier sur l'influence de la température et de l'intensité d'excitation [74]. Il a également été montré que des mutants de *Chlamydomonas* dépourvus de carotène ne présentaient plus d'augmentation de densité optique vers 520 nm, augmentation qui a été attribuée à une photooxydation du carotène.

Enfin, nous avons eu connaissance de résultats obtenus par LAND et coll [105] en radiolyse pulsée. Ces auteurs ont mesuré le coefficient d'extinction du carotène triplet : $\sim 2.10^5$, valeur qui est en bon accord avec nos résultats.

Les résultats des auteurs précédents et ceux que nous avons obtenus suffisent-ils pour affirmer que l'état transitoire mis en évidence en spectroscopie par éclairs est l'état triplet du carotène ? Pour résumer l'argumentation, disons qu'il s'agit d'un état, formé par une réaction quasiment contrôlée par la diffusion (ou même beaucoup plus rapide en milieu rigide) entre le carotène et l'état triplet de divers sensibilisateurs qui ne sont pas transformés par cette réaction. L'état transitoire formé a les mêmes propriétés avec divers sensibilisateurs, et il est désactivé très efficacement par l'oxygène et l'oxyde nitrique. En milieu dépourvu d'oxygène la désactivation de cet état transitoire, toujours rapide, même à 77 °K, laisse le carotène inchangé, sauf une certaine formation d'isomères cis.

Les arguments présentés permettent de dire d'abord que le carotène est seul à participer à cet état (il n'y a pas formation de complexe, ni réaction photochimique). Cet état ne peut être qu'un triplet ou un biradical ; nous n'entrerons pas dans la controverse sur la distinction entre ces deux états et nous accepterons que nous avons affaire à un état triplet.

D - PHOTOREACTIONS DU CAROTENE AVEC LE BLEU DE TOLUIDINE. ETAT TRIPLET ET FORME OXYDEE DU CAROTENE.

D-1 A la suite des travaux du groupe de CHICHESTER [69] [127] étudiant le rôle du carotène dans les effets photodynamiques, notre attention a été attirée sur les réactions du carotène avec le bleu de toluidine (BT) excité. En effet les auteurs précédents ont montré :

- que des levures (*Rhodotula glutinis*) imprégnées de BT étaient tuées à la suite d'un éclaircissement dans les bandes d'absorption de ce pigment, en présence d'oxygène (effet photodynamique).

- que la vitesse de cette photodestruction était ralentie pour des souches contenant des caroténoïdes.

- que l'irradiation d'une solution de carotène et de BT par de la lumière absorbée par ce dernier pigment conduisait à une destruction du carotène, seulement en présence d'oxygène. L'analyse du milieu après éclaircissement révélait la présence de produits d'oxydation du carotène.

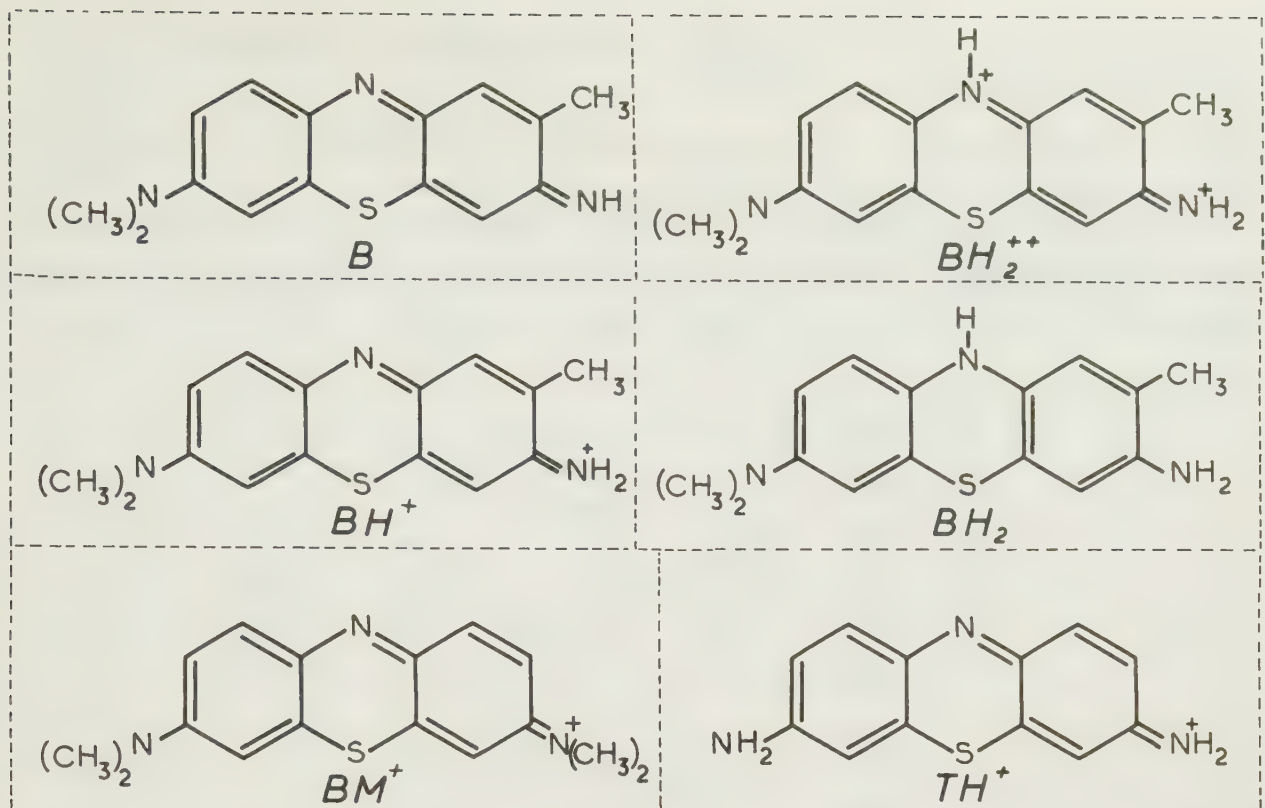
Il nous a semblé que ces observations pouvaient s'interpréter par des photooxydations consécutives au peuplement de l'état triplet du BT, et que le carotène exerçait un rôle protecteur par suite du transfert d'énergie $^3\text{BT} \rightarrow ^3\text{Car}$. Le carotène triplet ainsi formé pouvait être lui-même oxydé en présence d'oxygène. Pour vérifier cette hypothèse nous avons essayé de détecter, en spectroscopie par éclairs, la formation de ^3Car suivant l'excitation du BT, les pigments étant en solution dans un mélange 2/3 méthanol - 1/3 hexane, identique à celui qu'utilisaient CHICHESTER et coll. [69]. Des expériences préliminaires ont permis de déceler une augmentation de DO vers 500-530 nm, de courte durée de vie (de 5 à 20 μs), qui pouvait être due à l'état triplet du carotène ; en outre nous avons observé une diminution de DO dans les bandes d'absorption du carotène (vers 450 nm), lentement réversible ($t_{1/2} \sim 200 \mu\text{s}$). Ce dernier phénomène nous a semblé assez inexplicable compte tenu des propriétés connues du carotène ; pour l'élucider nous avons effectué une étude plus approfondie du système BT-carotène, en commençant par l'étude des photoréactions du BT seul, en solution.

Abréviations utilisées dans ce chapitre (voir aussi le glossaire général) : ATU : allylthiourée
 PPDA : paraphénylènediamine ; BT : bleu de toluidine ; BM : bleu de méthylène.
 ($\text{C}, \text{CH}^+, \text{CH}_2^{++}$), ($\text{B}, \text{BH}^+, \text{BH}_2^{++}$), ($\text{T}, \text{TH}^+, \text{TH}_2^{++}$), ($\text{BM}^+, \text{BMH}^{++}$) : formes de protonation d'un colorant thiazinique, du BT, de la thionine et du BM, respectivement. Les états triplets seront affectés du chiffre 3 (par exemple : $^3\text{BH}^+$), et les formes semi-réduites de la thionine et du BT seront désignées : $\text{TH}^\cdot, \text{TH}_2^{+\cdot}, \text{BH}^\cdot, \text{BH}_2^{+\cdot}$.

D-2 Etude des propriétés spectroscopiques et photochimiques du bleu de toluidine en solution.

D-2-1 Données chimiques et physico-chimiques

Le bleu de toluidine (BT = bleu de toluidine 0 : Basic Blue 17) appartient à la famille des colorants thiaziniques, avec la thionine et le bleu de méthylène (figure 30). Il existe dans la famille de nombreux composés qui diffèrent par les substituants sur le noyau phénazathionium, surtout éthyle et méthyle. Les propriétés physico-chimiques des colorants thiaziniques sont très voisines ; elles évoluent progressivement quand on augmente le nombre de groupements méthyle en particulier.



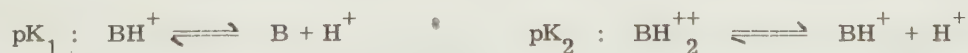
- Figure 30 -

Formules des trois formes de protonation du BT (B , BH^+ , BH_2^{++}), de la forme monoprotonée de la thionine (TH^+), et du bleu de méthylène (BM^+).

Le BT commercial est un mélange qui a été purifié comme il est indiqué au paragraphe B-2-3. Le spectre d'absorption du BT purifié, en solution dans l'eau, est donné sur la figure 31. Ce spectre est sensible à trois catégories de facteurs : pH, concentration, potentiel redox.

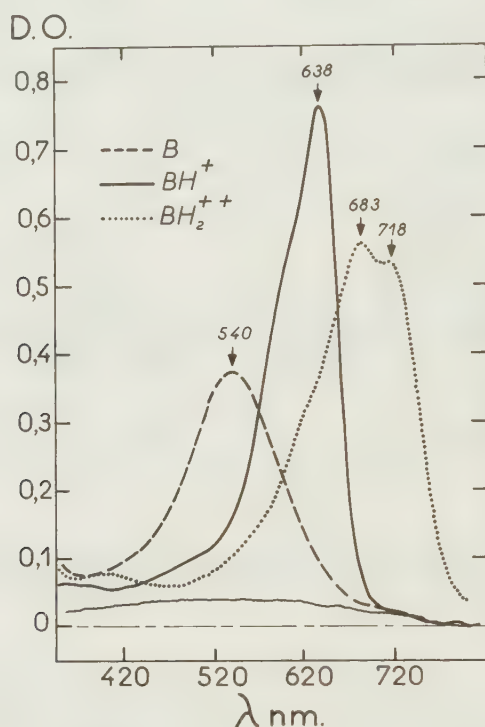
a) Influence du pH. Formes de protonation

Suivant le pH le BT présente trois formes de protonation (figure 30 et 31) présentant des spectres d'absorption très différents. Nous appellerons ces formes B (pic d'absorption à 540 nm), BH^+ (638 nm) et BH_2^{++} (683 et 718 nm). Nous avons déterminé les pK apparents pour les deux équilibres :



en portant $\log \frac{[B]}{[BH^+]}$ et $\log \frac{[BH^+]}{[BH_2^{++}]}$ en fonction du pH. Les concentrations ont été

estimées à partir des spectres d'absorption de solutions de BT dans de l'eau distillée à différents pH. Les mesures ont été effectuées avec des concentrations voisines de $4 \cdot 10^{-6}$ M (cuves de 5 cm de trajet optique), en présence de 5 % d'éthanol pour minimiser les distorsions dues à la dimérisation du colorant. On ajoute progressivement de la soude 10 N ou de l'acide sulfurique 36 N ; les modifications de spectre sont réversibles.



- Figure 31 -

Spectres d'absorption des trois formes de protonation du BT dans l'eau (+ 5 % d'éthanol). Cuve 1 cm. Même concentration : $0,95 \cdot 10^{-5}$ M

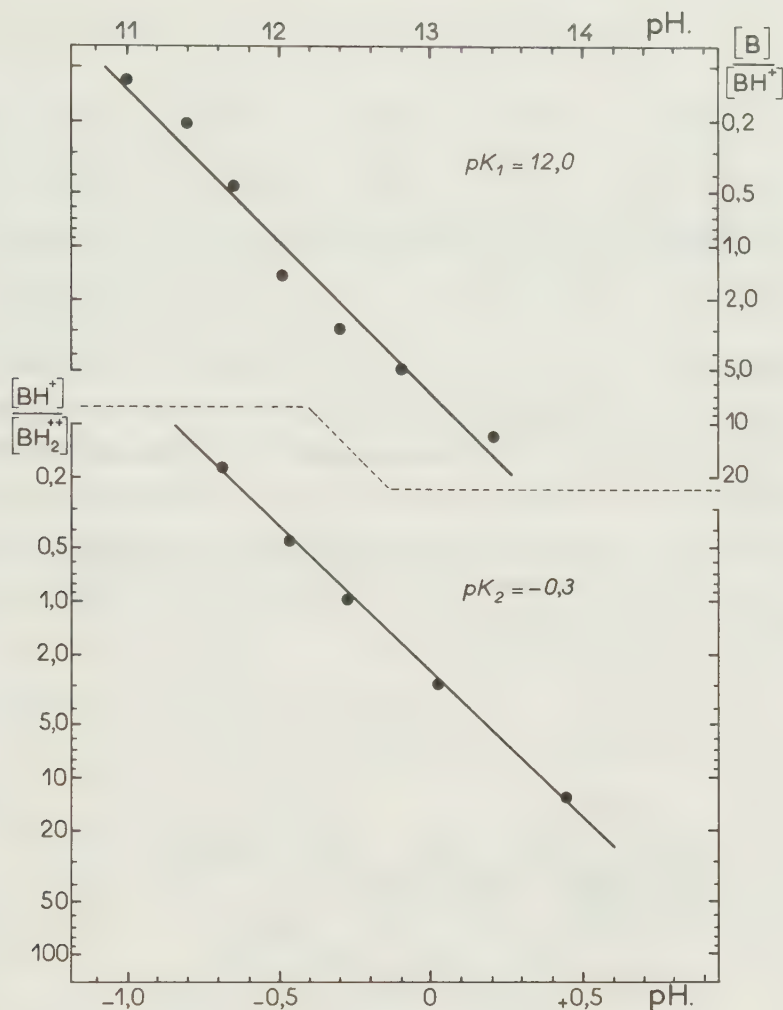
On a les relations :

$$K_1 = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]} \quad pK_1 = pH - \log \frac{[B]}{[BH^+]} = pH - \log \frac{DO(B, 540 \text{ nm})}{DO(BH^+, 638 \text{ nm})} \times \frac{\epsilon(BH^+, 638)}{\epsilon(B, 540)}$$

Le rapport des coefficients d'extinction molaires peut être obtenu à partir de solutions de B et de BH⁺ de même concentration : $\frac{\epsilon(BH^+, 638)}{\epsilon(B, 540)} = 2,2$. On obtient graphiquement $pK_1 = 12,0$, en bon accord avec les valeurs trouvées par FAURE et coll [50] pour d'autres colorants thiaziniques (entre 11,0 et 12,0).

La même méthode appliquée à l'évaluation de pK_2 fournit $pK_2 = -0,3$, en prenant

$$\frac{\epsilon(BH_2^{++}, 718)}{\epsilon(BH^+, 638)} = 0,7 \text{ (figure 32).}$$



- Figure 32 -

Détermination des deux pK acide-base du bleu de toluidine dans l'eau.

Dans notre travail avec le carotène nous avons utilisé comme solvant l'éthanol, qui dissout bien le BT et suffisamment le carotène, en ajoutant quelques % de benzène ou d'hexane. Dans l'éthanol on trouve les mêmes formes de protonation, avec un spectre d'absorption un peu affiné :

B : pic à 524 nm - BH^+ : pic à 630 nm ($\epsilon = 74\,000$) - BH_2^{++} : pics mal définis vers 687 et 719 nm. Compte tenu des valeurs des pK, le BT est pratiquement uniquement sous forme BH^+ dans l'éthanol neutre.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données sur le coefficient d'extinction du BT dans l'éthanol. Le colorant non purifié nous a donné une valeur de 43 000, valeur nettement trop faible due à la présence d'impuretés. Nous n'avons pas pu faire de mesure sur le colorant purifié, que nous avions en trop faible quantité. MICHAELIS et GRANICK [129] ont publié la valeur 63 000 pour le BT dans l'eau. Pour les colorants thiaziniques

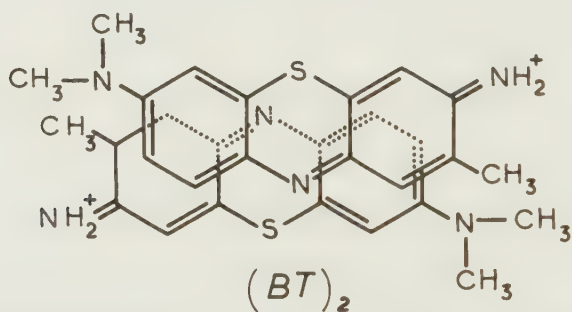
l'absorption est plus forte dans l'éthanol que dans l'eau. La thionine dans l'éthanol a un coefficient d'extinction de 74 000 [144], et le BM de 95 000 [9]. Il est probable que le coefficient d'extinction du BT est compris entre ces deux valeurs. Pour la suite nous avons supposé arbitrairement $\epsilon(\text{BH}^+, 630 \text{ nm}) = 74\,000$.

b) Influence de la concentration. Dimérisation

Le spectre d'absorption de solutions aqueuses de BT varie avec la concentration. Cet effet existe aussi pour les autres colorants thiaziniques, en particulier pour le bleu de méthylène. La constante d'association, à 20° , est de $7,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour le BT et $4,67 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour le BM [40]. DE GROOTE a observé le peuplement progressif de la forme dimère en abaissant la température, et il a situé à 590 nm le pic d'absorption du dimère [37].

Nous avons retrouvé cette dimérisation en faisant le spectre d'absorption de solutions de concentration variant entre $2,3 \cdot 10^{-7}$ et $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. L'adjonction d'une faible quantité d'éthanol, de l'ordre de quelques %, suffit à faire disparaître le pic du dimère.

Une structure a été proposée pour le dimère de BM par BERGMANN et O'KONSKI [9]. Le dimère serait maintenu par les forces de dispersion de LONDON et par liaison hydrophobe, ces forces dépassant la répulsion électrostatique entre les deux monomères chargés positivement. Les deux molécules, planes, seraient disposées en sandwich. On peut écrire une structure semblable pour le BT (figure 33).



- Figure 33 -

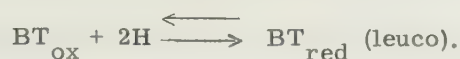
Structure proposée pour le dimère de bleu de toluidine .

L'étude photochimique des colorants thiaziniques en solution aqueuse est compliquée par l'existence de ces formes dimères. DANZIGER et coll [34] ont mis en évidence, pour le BM, des états transitoires attribués aux dimères. Dans notre travail avec le carotène le solvant a toujours été l'éthanol, dans lequel le dimère est entièrement dissocié.

c) Propriétés oxydo-réductrices

Dans leur forme habituelle, sous air, les colorants thiaziniques sont sous forme oxydée, de type quinonoïde. Comme les quinones ils présentent des formes semi-réduites et complètement réduites ou leuco. Le BT, dans sa forme leuco ou BH_2 , n'absorbe plus dans le visible ; dans l'ultra-violet la bande d'absorption se déplace de 290 à 255 nm [94]. Pour toute la série des colorants thiaziniques le potentiel rédox est très voisin ; il a été déter-

miné par RAPKINE et coll [145], qui ont montré que l'équilibre mettait en jeu deux électrons, soit 2H :



En fonction du pH les valeurs suivantes ont été obtenues :

pH	4	5	6	7	8	9
potentiel redox (mV)	+ 180	+ 100	+ 50	+ 10	- 20	- 50

Ces valeurs du potentiel redox ont permis d'utiliser le BT comme accepteur d'électrons dans la réaction de HILL (réaction photochimique de dégagement d'oxygène avec des chloroplastes isolés).

D-2-2 Propriétés photochimiques

Nous les citons ici sans entrer dans le détail des mécanismes proposés. Ici encore les propriétés des colorants thiaziniques sont très voisines et les mieux étudiées sont celles de la thionine et du BM.

D-2-2-1 Photoréduction en présence d'un réducteur

En solution aqueuse les colorants thiaziniques sont réduits en leur forme leuco par éclairement, en l'absence d'oxygène, en présence de nombreux réducteurs : thiourée, ATU, EDTA, triméthylamine, NADH, NADPH, ions Fe^{++} [50] [70] [96] [165].

La vitesse de cette réduction est affectée d'une manière assez complexe par le pH, la concentration et la nature du tampon.

Nous avons observé cette réaction, qui est très rapide, avec le BT en solution dans l'éthanol, en présence d'ATU (10^{-2}M). Le leuco-dérivé ainsi obtenu est stable pendant un temps supérieur à une heure, sous vide. L'addition de benzoquinone redonne exactement le spectre initial.

D-2-2-2 Photoréduction en l'absence de réducteur

Cette propriété a été mise en évidence par KOIZUMI et coll [94] ; elle est assez spécifique des colorants thiaziniques et son rendement est particulièrement bon pour le BT et le BM. KOIZUMI a étudié cette réaction dans l'eau, avec différents tampons pH. Nous avons reproduit ses observations avec le BT dans l'éthanol :

a) L'éclairement en lumière rouge, sous vide, de solutions de BT, entraîne une chute de DO à 630 nm ; cette chute est partiellement réversible par l'introduction d'air ou l'addition de benzoquinone. L'éclairement en milieu acide entraîne une photoréduction assez faible, non réversible par l'air, mais complètement réversible par la benzoquinone. Quand le pH croît, la vitesse de photoréduction croît également ; toutefois en présence d'air ou de benzoquinone, il y a réoxydation sans retour au spectre de départ : il y a un déplacement de l'absorption vers le bleu, en relation avec l'intensité de la réduction et avec la basicité du milieu.

La figure 34 donne un exemple de ces observations. Nous avons obtenu des résultats similaires en solution aqueuse (plus 20 % d'éthanol), avec des tampons pH. KOIZUMI et coll. [94] ont interprété le déplacement du pic d'absorption comme étant dû à une déméthylation.

b) L'éclairement sous air, dans des conditions qui produisent un effet important sous vide, n'entraîne aucune modification du spectre d'absorption. Toutefois un éclairement prolongé entraîne une légère diminution de DO et un déplacement du pic vers les courtes longueurs d'onde, surtout en milieu alcalin (déméthylation). Le pigment est donc protégé par l'oxygène, probablement par désactivation d'un état excité impliqué dans la déméthylation.

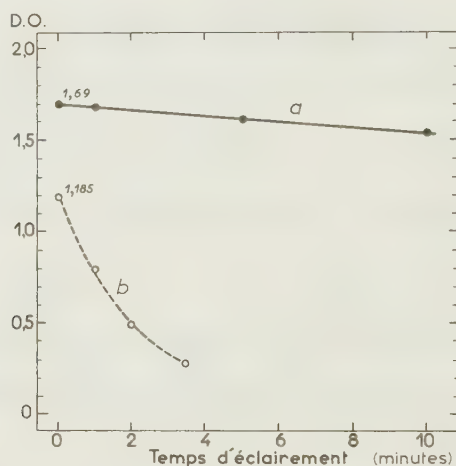
c) La photoréduction est ralentie quand on augmente la viscosité par addition de glycérol, ou par refroidissement. Nous avons par exemple obtenu les résultats suivants :

cuve contenant du BT dans 2/3 éthanol-1/3 glycérol, sous vide

DO initiale : 1,02 - Après 8 minutes d'éclairement à 26 ° : DO = 0,23

DO initiale : 0,98 - Après 8 minutes d'éclairement à - 20° : DO = 0,91

Sur le plan technique la photoréduction du BT, sous vide, rend indispensables un certain nombre de précautions : stockage et dégazage des solutions à l'obscurité ; petit nombre d'éclairs reçus par chaque cuve ; contrôle de DO avant et après les manipulations de spectroscopie par éclairs.



- Figure 34 -

Evolution de la DO ($\lambda=630$ nm) de deux solutions de BT dans l'éthanol, sous vide (cuve 1cm; $2,4 \cdot 10^{-5}$ M), consécutive à un éclairement (lampe quartz-iode, 625 w ; sur le trajet sont interposées : une cuve d'eau de 5 cm-un filtre anticalorique Calflex-un filtre interférentiel MTO 630 nm).

a) 2 ml d'éthanol + 0,1 ml de HCl 2N. A la fin de l'éclairement : DO = 1,54.

Si on ajoute alors une trace de benzoquinone : DO = 1,67; $\lambda_{\max} = 630$ nm.

b) 2 ml d'éthanol + 0,05 ml de NaOH 0,03 N. Une partie du BT est sous la forme B, dont l'absorption est négligeable à 630 nm. A la fin de l'éclairement : DO = 0,275. Si on ajoute alors une trace de benzoquinone :

DO = 0,92 ; $\lambda_{\max} = 617$ nm.

D-2-2-3 Sensibilisation de photooxydations

Les colorants thiaziniques ont la propriété de photosensibiliser l'oxydation de certains composés, en particulier l'allylthiourée, par l'oxygène moléculaire. Il semblerait que cette

oxydation se fasse par des réactions redox impliquant le colorant, et non par l'oxygène singulet (KRAMER et MAUTE [100]).

D-2-3 Comportement en spectroscopie par éclairs

Un certain nombre d'auteurs ont étudié les colorants thiaziniques en spectroscopie par éclairs [49] [51] [70] [88]. Nous n'avons pas repris une étude complète pour le BT, mais simplement vérifié que les résultats obtenus auparavant, essentiellement pour la thionine et le BM, étaient également valables pour le BT. Il y a toutefois certaines divergences qui seront détaillées.

Les cinétiques rapides ont été effectuées avec le laser à rubis comme source d'excitation. On obtient ainsi des signaux correctement mesurables, mais le taux d'excitation est toujours très faible. En effet le coefficient d'extinction de BH^+ à la longueur d'onde du rubis est très faible : de l'ordre de 150, soit $2 \cdot 10^{-3}$ du maximum. On n'est donc pas à l'abri d'une sérieuse cause d'erreur qui consisterait à exciter préférentiellement une impureté, même présente en très faible quantité, mais qui aurait à 6943 Å un coefficient d'extinction important. C'est la raison pour laquelle les expériences avec laser ont été recoupées par des expériences où l'excitation provenait d'un tube-éclair classique.

D-2-3-1 Etats triplets

a) ${}^3BH_2^{++}$ -

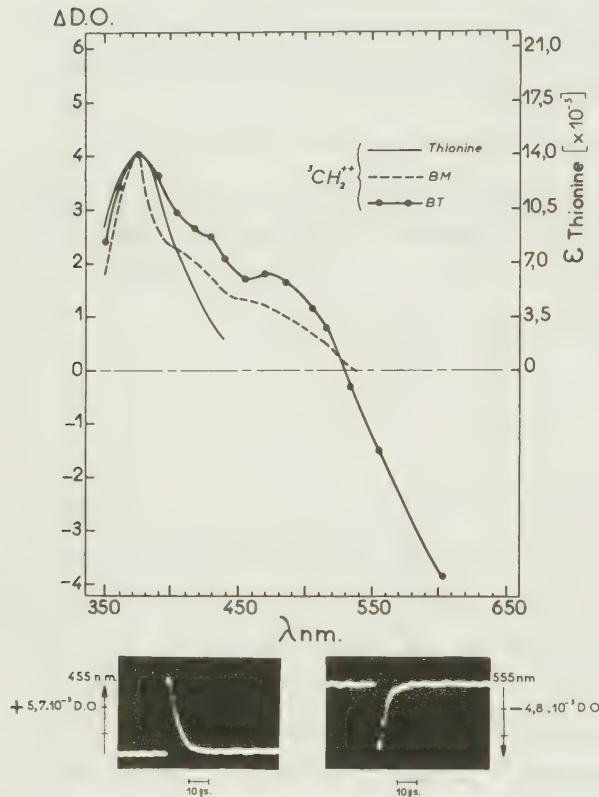
HATCHARD et PARKER [70], travaillant avec la thionine dans l'acide sulfurique 0,1 N, ont mis en évidence un état métastable de durée de vie 20 μs , en fait comparable à la durée de leur flash. FISCHER [51] a confirmé le spectre de cet état métastable (figure 35) et il l'a attribué à la forme ${}^3TH_2^{++}$, état triplet de la forme biprotonée ; il a trouvé une durée de vie $\tau = 11$ à 12 μs . FAURE et coll. ont obtenu des résultats similaires [49].

La forme ${}^3TH_2^{++}$ de la thionine présente deux pics d'absorption, vers 375 et vers 650 nm. La forme ${}^3BMH^{++}$ du BM a été décrite par le groupe de KOIZUMI : pic d'absorption à 375 nm, durée de vie inférieure à 30 μs [88].

Nous avons observé la forme ${}^3BH_2^{++}$ du BT en spectroscopie par éclairs avec le laser à rubis. La cuve, contenant 1 ml de BT dans l'éthanol + 1 ml de HCl 11 N + 1 ml de glycérol, a été dégazée avant la manipulation. Le glycérol a été ajouté pour augmenter la viscosité et diminuer la vitesse des réactions bimoléculaires. Dans le milieu précédent la quasi-totalité du BT est sous la forme BH_2^{++} , qui présente une absorption importante à 6943 Å. On observe un signal de très courte durée ($t_{1/2} = 2,6 \mu s$), de décroissance exponentielle (figure 35). Sur la même figure est reporté le spectre de différence correspondant, qui présente un maximum vers 375 nm. Il ne nous a pas été possible de tracer le spectre au-delà de 600 nm à cause de parasites lumineux trop importants.

Pour les colorants thiaziniques les spectres obtenus sont très semblables (figure 35); par contre nous observons un temps de vie nettement plus court que les autres auteurs. Il est possible que cette différence provienne d'une meilleure résolution temporelle grâce au laser. Il est possible aussi qu'elle provienne du solvant ; il a été signalé [98] que la forme ${}^3CH_2^{++}$ réagissait avec l'éthanol pour donner le colorant semi-réduit. Toutefois FISCHER [51]

a montré qu'à 400 nm les ϵ de la semi-thionine et de $^3\text{TH}_2^{++}$ étaient voisins : de l'ordre de 8000. Nos résultats sur le BT confirment ce point (paragraphe D2.3.2 a). Le caractère purement exponentiel de la décroissance du signal que nous observons à cette longueur d'onde indique que l'éventuelle production de forme semi-réduite est très faible dans notre expérience. Il est possible aussi que les propriétés de $^3\text{CH}_2^{++}$ soient assez différentes pour les divers colorants thiaziniques ; FAURE et coll. ont observé le pic d'absorption de la thionine triplet biprotonée, vers 650 nm, mais ils n'ont rien décelé pour le BM ni pour les azurs [49]



- Figure 35 -

- Spectres de formes $^3\text{CH}_2^{++}$

Spectre d'absorption de la forme $^3\text{TH}_2^{++}$ (FISCHER [51])

Spectre de différence dû au peuplement de $^3\text{BMH}_2^{++}$ (KOIZUMI et coll [88])

Spectre de différence de BH_2^{++} obtenu dans les conditions ci-dessous.

- Oscillogrammes. Variations d'absorption d'une solution de BT dans 1/3 éthanol, 1/3 glycénol, 1/3 HCl 11 N. Cuve carrée 10 mm, sous vide, excitée par le laser à rubis.

DO de la cuve à 694 nm : 0,44

PM XP 1141 ; $R_c = 1 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 5 \text{ nm}$

b) $^3\text{BH}^+$ -

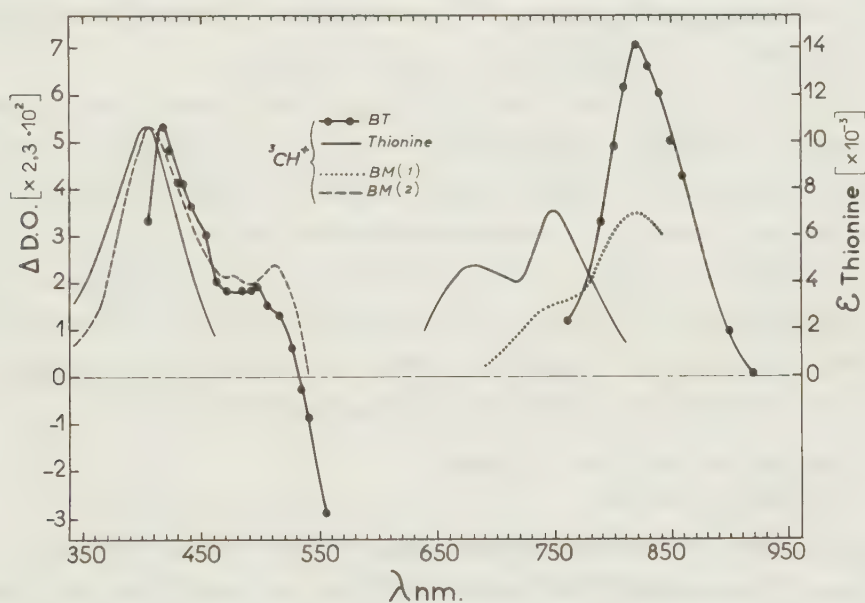
FISCHER [51], travaillant sur la thionine dans l'eau, en milieu tamponné à pH 8, a décrit le spectre de la forme $^3\text{TH}^+$; ce spectre présente deux pics principaux, vers 410 et 760 nm (figure 36). La même année KOIZUMI et coll [88] ont décrit l'état triplet du BM ($^3\text{BM}^+$) en solution dans l'eau distillée : durée de vie $\tau = 80 \mu\text{s}$, pics d'absorption à 415, 520 et vers 800 nm. Ces résultats ont été confirmés et étendus par les travaux ultérieurs, en particulier par :

- FAURE et coll [49], qui ont donné le spectre de la forme $^3\text{CH}^+$ pour la thionine (pic à 775 nm - $\epsilon_{\text{max}} = 1,0 \cdot 10^4$ - $\tau = 60 \mu\text{s}$), pour les azurs (pic entre 790 et 810 nm - $\tau = 90 \mu\text{s}$) et pour le BM (pic à 825 nm - $\epsilon_{\text{max}} = 1,8 \cdot 10^4$ - $\tau = 90 \mu\text{s}$), dans l'eau distillée (figure 36). Ces auteurs ont également étudié l'effet du tampon (pH et concentration) sur ces états transitoires.

- DANZIGER et coll [34] qui ont décrit les propriétés de $^3\text{BM}^+$ obtenu par excitation avec un laser à rubis : pics à 420 et 820 nm, $t_{1/2} = 30 \mu\text{s}$ (dans l'eau distillée [34]).

En ce qui concerne le BT on ne trouve pas de données détaillées dans la littérature. KOIZUMI, à partir de méthodes indirectes, donne une durée de vie de $10 \mu\text{s}$ [94]. On peut aussi extrapoler certaines propriétés à partir des résultats de FAURE et coll [49] sur les azurs ; en effet le BT est très voisin de l'azur A, qui est dépourvu du CH_3 (pour l'azur A : pic d'absorption à 800 nm, durée de vie d'environ $90 \mu\text{s}$).

Le spectre correspondant au peuplement de $^3\text{BH}^+$ a été déterminé en excitant une solution de BT dans l'éthanol avec le laser ou avec un tube-éclair (figure 36), en mesurant la variation de DO au temps zéro (temps minimum après l'excitation : $1 \mu\text{s}$ pour le laser, $50 \mu\text{s}$ pour le tube-



- Figure 36 -

Spectres de formes $^3\text{CH}^+$:

- Thionine dans l'eau, tampon pH 8,0. FISCHER [51]
- Bleu de méthylène dans l'eau (BM_1), tampon pH 8,4. FAURE et coll [49]
- Bleu de méthylène dans l'eau (BM_2), non tamponnée. KATO et coll [88]
- BT. Spectre de différence obtenu avec une solution de BT ($2,2 \cdot 10^{-5}\text{M}$) dans l'éthanol, sous vide. Cuve carrée 10 mm.
 $\lambda < 600 \text{ nm}$: excitation par tube-éclair (éclair de $30 \mu\text{s}$; lumière filtrée par filtre Schott RG1, 3 mm + Calflex). PM XP 1141 ; $R = 10 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 7 \text{ nm}$.
 $\lambda > 700 \text{ nm}$: excitation par le laser à rubis. PM 56 CVP ; $R = 1 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$.

Pour le raccordement des deux parties du spectre nous avons utilisé les ΔDO à 417 et à 496 nm, qui ont été mesurées également par excitation laser.

éclair). La partie du spectre correspondant à $\lambda < 600$ nm a été mesurée par les deux techniques qui donnent des résultats identiques. Nous avons estimé le coefficient d'extinction de $^3\text{BH}^+$ en mesurant la variation de D0 à 630 nm et en supposant qu'à cette longueur d'onde l'absorption de $^3\text{BH}^+$ est négligeable par rapport à celle de BH^+ ($\epsilon \sim 74\,000$). On trouve 8 300 à 417 nm et 11 100 à 830 nm ($\pm 10\%$, compte non tenu de l'imprécision sur le coefficient d'extinction de BH^+). Nos résultats sont en accord avec les données publiées pour les autres colorants thiaziniques.

La mesure du temps de vie de $^3\text{BH}^+$ est compliquée par les réactions de cet état triplet avec BH^+ et avec les protons (ces aspects seront détaillés aux paragraphes D2.3.1c et D2.3.2c). Nous avons opéré de deux façons, toujours sans addition d'aucun agent acide ou basique et sous vide. Nous avons mesuré le $t_{1/2}$ de retour des augmentations de DO produites par excitation avec un tube-éclair, à 417 et 730 nm, pour des solutions très diluées ($3 \cdot 10^{-6}$ M) de BT dans l'éthanol pur ou dans 1/3 éthanol-2/3 glycérol. Dans ce dernier milieu nous avons observé, aux deux longueurs d'onde, des cinétiques de retour exponentielles, de même demi-vie, ce qui, dans le cas particulier, est un bon indice de l'absence de réaction de $^3\text{BH}^+$ avec BH^+ . En effet, dans le cas d'une telle réaction, l'absorption importante des produits à 417 nm (cf paragraphe D2.3.2c) donnerait des cinétiques différentes aux deux longueurs d'onde. C'est effectivement ce que l'on constate dans l'éthanol, à la même concentration de $3 \cdot 10^{-6}$ M (figure 37). On obtient ainsi $t_{1/2} = 200 \pm 10 \mu\text{s}$.

L'autre façon de procéder pour mesurer $t_{1/2}$ consiste à observer la cinétique de décroissance du signal dû à $^3\text{BH}^+$, par excitation laser, pour différentes concentrations en BT. Les décroissances sont approximativement exponentielles à 760 nm. La figure 39 d permet de déterminer l'inverse de la demi-vie à concentration nulle. On trouve $t_{1/2} = 140 \pm 10 \mu\text{s}$ (éthanol pur). La divergence entre les valeurs trouvées par les deux méthodes n'est pas surprenante car il est probable que le temps de vie apparent de $^3\text{BH}^+$ est déterminé essentiellement par sa vitesse de réaction avec les protons. Pour la suite nous accepterons $t_{1/2} = 200 \mu\text{s}$, soit pour la constante de vitesse de désactivation : $3,5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$.

c) Autres propriétés des états triplets.

- niveaux d'énergie

La phosphorescence des colorants thiaziniques n'a jamais été rapportée à notre connaissance. Le niveau d'énergie de $^3\text{TH}^+$ a été déterminé par KRAMER [98] [99], par transfert d'énergie triplet-triplet. Des molécules dont le niveau triplet est connu peuvent agir comme donneurs ou au contraire comme accepteurs suivant que leur énergie est supérieure ou inférieure à celle du colorant. La réaction de transfert est observée directement en spectroscopie par éclairs ou indirectement, en continu, par la mesure du rendement de photo-réduction du colorant par ATU. La valeur suivante a été obtenue pour la thionine :

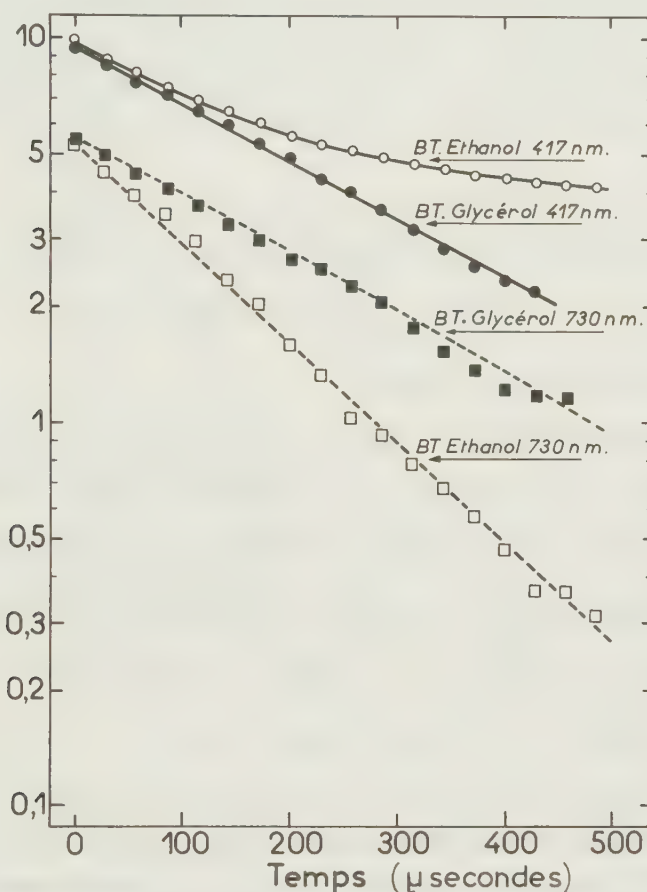
$$E(^3\text{TH}^+) = 39 \pm 1 \text{ kcal. mole}^{-1} \text{ (soit } 13\,640 \text{ cm}^{-1}\text{)}$$

KRAMER n'a trouvé aucun colorant dont le niveau d'énergie soit inférieur à celui de $^3\text{TH}_2^{++}$. Il a estimé son niveau d'énergie par le calcul, à partir des pK de l'état triplet et de l'état fondamental, et il a donné la valeur : $E(^3\text{TH}_2^{++}) = 28 \pm 2,5 \text{ kcal. mole}^{-1}$ (soit $9\,800 \text{ cm}^{-1}$).

Les formes $^3\text{CH}^+$ sont très semblables pour tous les colorants thiaziniques : on peut donc accepter une énergie de $39 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour $^3\text{BH}^+$. Par contre on ne peut rien conclure a priori pour la forme $^3\text{BH}_2^{++}$ pour laquelle il semble que certaines propriétés varient beaucoup dans la série. Le temps de vie court est en faveur d'un niveau d'énergie très bas.

- Propriétés acido-basiques

Le pK de l'équilibre $^3\text{DH}_2^{++} \rightleftharpoons ^3\text{DH}^+ + \text{H}^+$ a été déterminé par différents auteurs, en spectroscopie par éclairs ou par des méthodes indirectes basées sur le rendement de photoréduction [49] [50] [51] [88]. Les valeurs trouvées sont toutes comprises entre 6,3 et 7,5 pour les colorants thiaziniques. Pour l'azur A, très proche du BT, la valeur est de 7,2



- Figure 37 -

Cinétiques de retour des signaux d'augmentation de DO obtenus par excitation avec un tube-éclair ($t_{1/2} = 20 \mu\text{s}$) de cuves contenant 3.10^{-6} M de BT dans l'éthanol (courbes marquées BT-Ethanol) ou dans un mélange 1/3 éthanol 2/3 glycérol (courbes marquées BT-Glycérol). Le temps zéro du graphique est pris $80 \mu\text{s}$ après le début de l'éclair excitateur.

Excitation entre 600 et 650 nm (filtre RG 1,3 mm + 2 filtres Calflex).

λ_{analyse} : 417 et 730 nm. PM XP 1141 ; $R_c = 20 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$

$t_{1/2}$ obtenus :

BT-Ethanol : 730 nm : $100 \pm 10 \mu\text{s}$ - 417 : non-exponentiel

BT-Glycérol : 730 et 417 nm : $200 \pm 10 \mu\text{s}$.

(dans l'eau) [49]. Il faut remarquer le très grand écart entre ce pK de l'état triplet et le pK correspondant dans l'état fondamental ($\sim -0,3$). Un tel écart est assez exceptionnel pour des états triplets.

Hormis pour quelques expériences préliminaires nous avons toujours travaillé en l'absence de tampon pH. Ce choix a été motivé par deux raisons. La première est que la nature du tampon joue un rôle mal compris sur certaines propriétés des états triplets des colorants thiaziniques et sur leurs réactions photochimiques [49] [94] ; il n'était pas sans intérêt d'éliminer cette cause de complications. La seconde raison est plus fondamentale et tient à la courte durée de vie de ${}^3\text{BH}_2^{++}$ ($\sim 3,7 \mu\text{s}$) ; en effet le pK n'a de sens que s'il y a réellement équilibre entre les différentes formes de protonation. En suivant des considérations développées par LINDQVIST [108] on voit que la réalisation d'un équilibre acido-basique impliquant une espèce de durée de vie $3,7 \mu\text{s}$ nécessite généralement une concentration en tampon supérieure à 10^{-2}M . Une telle concentration est pratiquement impossible à réaliser dans l'éthanol. Nous avons donc accepté de travailler en l'absence de tampon pH plutôt que d'utiliser un tampon à effet mal défini.

D.2.3.2 - Réactions d'oxydo-réduction des états triplets des colorants thiaziniques

Les colorants thiaziniques à l'état triplet sont capables de réagir avec des réducteurs ou avec d'autres molécules de colorant à l'état fondamental, suivant des réactions qui vont être exposées maintenant.

a) Réactions avec des réducteurs

HATCHARD et PARKER [70] ont observé que l'état triplet de la thionine, en milieu H_2SO_4 0,1N, réagissait avec les ions Fe^{++} . Cette réaction produit, avec un rendement voisin de 1, la forme semi-réduite ou semi-thionine, analogue à une semi-quinone. La constante de vitesse de la réaction est de $3 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Cette observation initiale a été ensuite étendue aux autres colorants thiaziniques et à d'autres réducteurs : EDTA, triméthylamine, thiourée, ATU, PPDA, isopropanol, méthanol, etc... FAURE et coll [50] ont bien montré que cette réaction avait lieu essentiellement avec la forme ${}^3\text{CH}_2^{++}$. Toutefois des observations de KOIZUMI et coll [96] laissent supposer que la forme ${}^3\text{CH}^+$ peut également être réduite (par EDTA et ATU).

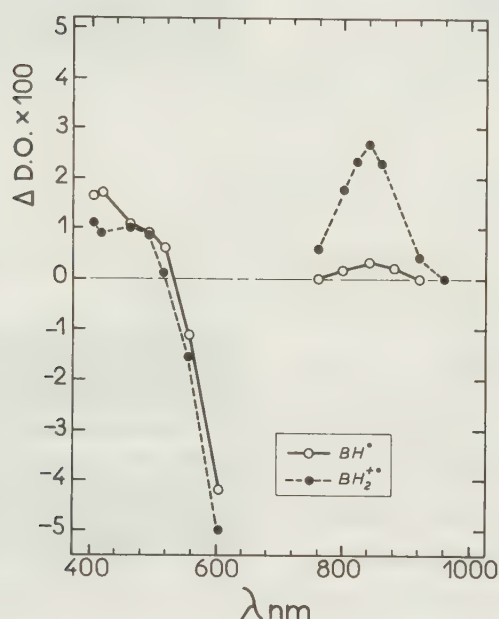
Le spectre de la forme semi-réduite a été obtenu par HATCHARD et PARKER [70] pour le radical semi-thionine (probablement $\text{TH}_2^{\cdot+}$). Un spectre plus complet a été publié par FISCHER [51] ; la semi-thionine présente deux pics d'absorption, à 390 et 750 nm. Le spectre est en fait très proche de celui de ${}^3\text{TH}^+$, ce qui complique l'interprétation des signaux de spectroscopie par éclairs. La semi-thionine ne peut pas réagir avec l'oxygène, mais par contre deux molécules de semi-thionine peuvent se dismuter pour donner la forme leuco TH_2 et une molécule de thionine [100]. Cette réaction serait analogue à celle qui a été proposée par LINDQVIST à propos de la fluorescéine [108].

Le devenir de la forme semi-réduite de la thionine et du BM a été étudié en détail par BONNEAU et coll [12], en particulier les équilibres de protonation, la dismutation, et la réaction inverse avec le réducteur oxydé (PPDA).

Nous n'avons trouvé aucune donnée précise sur les réactions de ${}^3\text{BT}$ avec les réducteurs. Nous avons donc cherché à vérifier s'il se comportait comme les autres colorants thiaziniques en observant :

- la réduction de durée de vie de ${}^3\text{BH}^+$ en présence de ATU ; il s'agit surtout d'une désactivation et il se forme très peu de radical semi-réduit.

- la formation de l'espèce semi-réduite, en présence de PPDA. La figure 38 montre les spectres de différence obtenus respectivement en milieu neutre et en milieu acide. Il y a disparition complète du signal de ${}^3\text{BH}^+$ et apparition d'un signal de longue durée (pas de retour visible en 1 ms). Les spectres sont comparables quantitativement. On peut interpréter ces deux spectres comme correspondant à la formation des semi-thionines mono et bi-protonées, suivant les réactions :



- Figure 38 -

Spectres de différence obtenus par excitation laser de solutions de BT ($1,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) dans l'éthanol, sous vide, en présence de PPDA ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). Cuve carrée, 10 mm.

Milieu neutre : pas d'addition - Milieu acide : + HCl $4 \cdot 10^{-3} \text{ N}$.

De 400 à 603 nm : PM XP 1141 - au-delà de 700 nm : PM 56CVP (ainsi que deux points à 417 et 491 nm pour le raccordement des deux parties du spectre).

$$R_c = 10 \text{ k}\Omega - \Delta\lambda = 10 \text{ nm.}$$

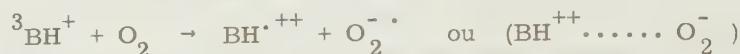
Il est possible que les spectres comportent une absorption due à PPDA_{ox} [130]. La comparaison avec la variation de DO due à ${}^3\text{BH}^+$ dans les mêmes conditions permet de faire une estimation du coefficient d'extinction : $\epsilon(\text{BH}_2^{+\bullet}, 840 \text{ nm}) \sim 22000$. Il est possible que chacun des spectres corresponde à un mélange en proportion différente de $\text{BH}^\bullet$ et de $\text{BH}_2^{+\bullet}$.

Si l'expérience précédente est effectuée sous air on constate une diminution de l'amplitude du signal de ΔDO d'environ un facteur 2, mais le temps de vie reste supérieur à 1 ms, ce qui confirme l'absence d'influence de l'oxygène sur les formes semi-réduites.

b) Réactions de ${}^3\text{BH}^+$ avec l'oxygène

En présence d'oxygène on observe principalement une diminution considérable de la durée de vie de l'état triplet (observé à 417 nm). Pour ${}^3\text{BH}^+$ sous air, dans l'éthanol, nous avons mesuré $t_{1/2} = 0,55 \mu\text{s}$. En prenant $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ comme solubilité de l'oxygène dans l'éthanol, sous air, à 21° , on trouve pour la désactivation une constante de vitesse : $k_0 = 5 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (on aurait $5,3 \cdot 10^9$ pour une réaction limitée par la diffusion).

Toutefois on peut observer que, sous air, il subsiste une augmentation de DO de longue durée de vie, aux alentours de 500 nm. Cette augmentation peut provenir de la réaction ${}^3\text{BH}^+ + \text{BH}^+$ (cf paragraphe suivant), mais cela est peu probable au vu des vitesses de réaction. Il est plus probable qu'on a la réaction :



Cette dernière réaction [108] existe pour un certain nombre de colorants : fluorescéine, éosine ; et KOIZUMI et coll [168] ont présenté des arguments en faveur d'une telle réaction avec le BM.

c) Réaction avec le colorant à l'état fondamental

En se basant sur des résultats de photoréduction du BT en l'absence de réducteur KOIZUMI et coll [94] ont démontré l'existence de la réaction :

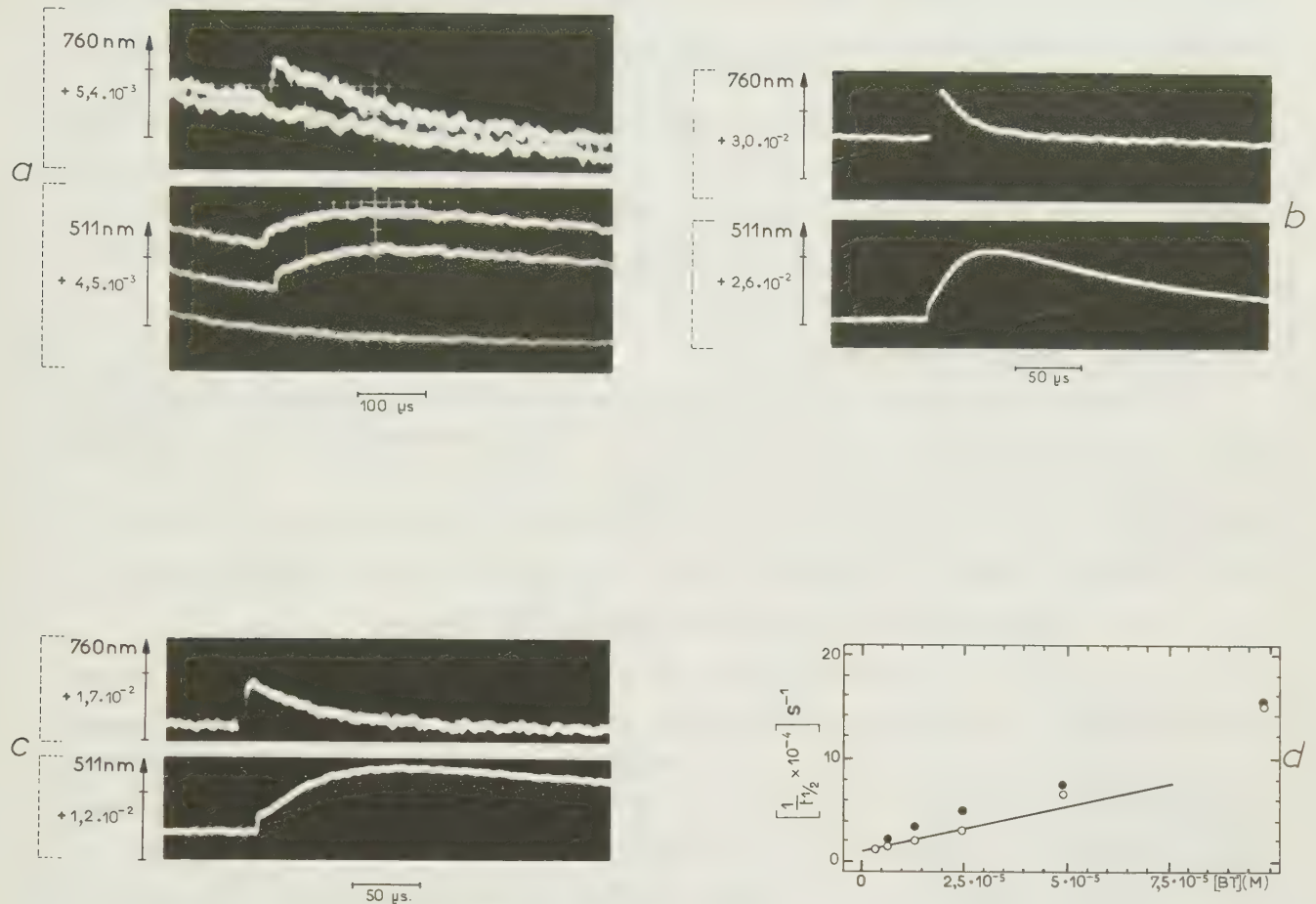


Une réaction semblable est aussi invoquée pour rendre compte des expériences de spectroscopie par éclairs avec le BM [88]. Le produit de la réaction pourrait être un état de transfert de charge du dimère, par transfert d'électron interne. DANZIGER et coll [34] ont observé le même produit par excitation directe du dimère du BM : demi-vie de $140 \mu\text{s}$, et absorption entre 400 et 550 nm, avec un maximum à 520 nm. Ils proposent d'écrire l'état de transfert de charge : $(\text{BM}^{\cdot++} \cdots \cdots \text{BM}^{\cdot-})$.

Nous avons effectué quelques expériences pour préciser ce qui se passe avec le BT dans l'éthanol, sous vide, en spectroscopie par éclairs avec le laser.

En présence de concentrations croissantes en BT, on observe d'abord une diminution de durée de vie de ${}^3\text{BH}^+$, observable correctement à 760 nm (figure 39). Sur la figure 39 d nous avons porté l'inverse de $t_{1/2}$ en fonction de la concentration en BT. On peut interpréter la variation de $t_{1/2}$ par une réaction bimoléculaire entre ${}^3\text{BH}^+$ et BH^+ ; la pente de la droite permet d'estimer la constante de vitesse à $5,9 \cdot 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Nous n'avons pas d'explication pour l'écart à la linéarité aux fortes concentrations.

Avec une cinétique peu différente on voit augmenter la DO vers 490-530 nm (figure 39). Les produits de la réaction de ${}^3\text{BH}^+$ avec BH^+ absorbent donc, dans cette région, plus que ${}^3\text{BH}^+$; entre 400 et 490 nm ils absorbent aussi, mais moins que ${}^3\text{BH}^+$, tandis que leur absorption n'est pas décelable au-delà de 700 nm. Signalons en outre que la demi-vie du produit qui absorbe à 520 nm diminue quand on augmente la concentration en BT : le $t_{1/2}$ est supérieur à $300 \mu\text{s}$ à la concentration de 10^{-5}M de BT, et il tombe à $70 \mu\text{s}$ à $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

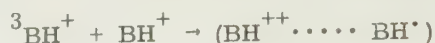


- Figure 39 -

Variations d'absorption du BT dans l'éthanol, excité par le laser. Cuve dégazée, 10 mm. PM XP 1141. $R_c = 4 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$. - a) concentration $6,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. b) concentration $5,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. c) Concentration $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, mais avec $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de NaOH. d) Diagramme obtenu en portant, en fonction de la concentration de BT dans l'éthanol, l'inverse de $t_{1/2}$ de :

- 760 : décroissance de l'augmentation de DO à 760 nm (${}^3\text{BH}^+$).
- 511 : augmentation de DO qui suit le peuplement de ${}^3\text{BH}^+$, à 511 nm (on mesure le temps pour obtenir la moitié du signal maximum).

De la même façon que les résultats obtenus avec le BM par KOIZUMI [88], ces résultats peuvent s'interpréter en première approximation par :



C'est probablement à partir du dimère par transfert de charge, et par des réactions faisant intervenir le solvant, que se forme BH_2 dont la production est démontrée en éclaircissement continu.

L'examen détaillé des cinétiques montre que ce schéma est insuffisant. Sur la figure 39c on voit que, après une montée brutale de la DO à 511 nm, montée correspondant au peu-plement de $^3\text{BH}^+$, il y a un petit replat avant que la DO ne recommence à augmenter. Ce replat est particulièrement net en milieu basique et il n'est pas expliqué par le schéma précédent qui prévoit une cinétique en $(1-e^{-kt})$.

D.2.4 Résumé des propriétés du BT

L'ensemble des réactions que peut donner le BT après un éclaircissement est très complexe. Sur le tableau suivant nous avons rappelé un certain nombre de résultats expérimentaux et les réactions les plus importantes qui sont observables pendant les temps assez courts (inférieurs à 10^{-3} s) accessibles par notre technique de spectroscopie par éclairs. Nous avons aussi rappelé les propriétés d'autres colorants thiaziniques. (tableau page 72)

D.3 Etude des réactions entre le BT excité et le carotène

La complexité des réactions du BT à la suite d'une excitation lumineuse fait penser que l'étude des réactions avec le carotène sera très complexe. C'est effectivement ce qui se passe et notre étude n'est en fait qu'une première approximation. Une simplification provient du fait que la vitesse de la réaction du carotène avec ^3BT est très rapide, pratiquement contrôlée par la diffusion. Une concentration assez grande en carotène permettra souvent d'éliminer la réaction de $^3\text{BH}^+$ avec BH^+ . Toutefois une forte concentration en carotène empêche toute mesure de variation de DO à des longueurs d'onde comprises entre 380 et 500 nm. Dans tout le domaine de longueur d'onde étudié les variations de DO dues aux états intermédiaires du BT seront largement dominées par celles des états intermédiaires du carotène, excepté vers 630 nm.

Le carotène est très peu soluble dans l'éthanol. Nous avons toujours préparé une solution de départ de carotène dans l'hexane, ou dans un mélange 1benzène-4éthanol. Cette solution, préparée juste avant la manipulation, était ensuite amenée à la concentration voulue par dilution à l'éthanol. La teneur en benzène n'a jamais dépassé 3 % dans la solution étudiée ; la teneur en hexane était comprise entre 5 et 10 % (sauf une expérience à 35 %, qui sera signalée). Nous avons effectué quelques expériences avec la zéaxanthine (3,3' dihydroxy-béta carotène) qui est bien soluble dans l'éthanol.

D.3.1 Influence du carotène sur la photoréduction du BT

a) Milieu neutre. Par suite d'un éclaircissement d'une solution de BT et de carotène dans l'éthanol, sous vide, on observe (figure 40) :

- une photoréduction du BT, caractérisée par une diminution de DO à 630 nm, partiellement réversible par addition de benzoquinone. L'influence du carotène sur la vitesse

Tableau - Quelques données quantitatives sur les photoréactions des colorants thiaziniques. R est un réducteur. Les constantes de vitesse des réactions bimoléculaires sont exprimées en $M^{-1}s^{-1}$

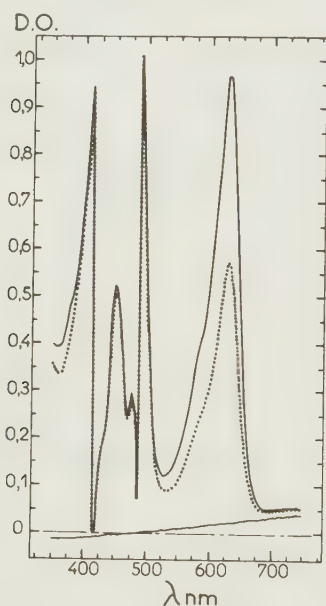
Réactions	Constante de vitesse des réactions pour :		
	BT	BM	Thionine
Réactions primaires : $\text{CH}^+ \xrightarrow{\text{lumière}} {}^1\text{CH}^+ \xrightarrow{k'_1} {}^3\text{CH}^+$ $\uparrow$ $k_1 (\text{conversion interne, fluorescence})$		$\frac{k'_1}{k_1 + k'_1} = 0,52 \text{ [133]}$	0,62 [133]
Réactions de ${}^3\text{CH}^+$: ${}^3\text{CH}^+ \xrightarrow{k_2} \text{CH}^+$ ${}^3\text{CH}^+ + \text{H}^+ \longrightarrow {}^3\text{CH}_2^{++}$ ${}^3\text{CH}^+ + \text{R} \xrightarrow{k_3} \begin{cases} \xrightarrow{k_{3a}} \text{CH}^+ + \text{R} \\ \xrightarrow{k_{3b}} \text{CH}^+ + \text{R}^+ \end{cases}$ ${}^3\text{CH}^+ + \text{CH}_2 \xrightarrow{k_4} \text{CH}^+ + \text{CH}_2$ ${}^3\text{CH}^+ + \text{CH}^+ \xrightarrow{k_5} (\text{CH}^{++} \cdots \text{CH}^+)$ ${}^3\text{CH}^+ + \text{O}_2 \xrightarrow{k_6} \begin{cases} \xrightarrow{k_{6a}} \text{CH}^+ + {}^1\text{O}_2 \\ \xrightarrow{k_{6b}} \text{CH}^{++} + \text{O}_2^- \end{cases}$	$k_2 = 3,5 \cdot 10^3 s^{-1}$ (paragraphe D.2.3.1b) PPDA , ATU (paragraphe D.2.3.2a) $k_5 = 5,9 \cdot 10^8$ (paragraphe D.2.3.2c) $k_6 = 5 \cdot 10^9$ (paragraphe D.2.3.2b) $k_{6a} \gg k_{6b}$	$11 \cdot 10^3$ [49] $pK = 7,5$ [49] R=EDTA R=ATU $k_3 = 1,2 \cdot 10^7$ $2,1 \cdot 10^6$ [96] $\frac{k_{3b}}{k_{3a}} = 1,0$ 0,052 $k_4 > 10^9$ [96]	$18 \cdot 10^3$ [49] $pK = 6,3$ [49]
Réactions de ${}^3\text{CH}_2^{++}$: ${}^3\text{CH}_2^{++} \xrightarrow{k_7} \text{CH}_2^{++}$ ${}^3\text{CH}_2^{++} + \text{R} \xrightarrow{k_8} \begin{cases} \xrightarrow{k_{8a}} \text{CH}_2^{++} + \text{R} \\ \xrightarrow{k_{8b}} \text{CH}_2^{++} + \text{R}^+ \end{cases}$	$k_7 = 2,7 \cdot 10^5 s^{-1}$ (paragraphe D.2.3.1a) PPDA (paragraphe D.2.3.2a)	$k_8 = 1,2 \cdot 10^7$ R=EDTA [96] $\frac{k_{8b}}{k_8} = 1,0$	$8,7 \cdot 10^4$ [51] $5,8 \cdot 10^7$ R=ATU [51] $\frac{k_{8b}}{k_8} = 0,28$
Réactions ultérieures $2 \text{CH}_2^{++} \xrightarrow{k_9} \text{CH}^+ + \text{H}^+ + \text{CH}_2$ $2 \text{CH}^+ \xrightarrow{k'_9} \text{C} + \text{CH}_2$ $(\text{CH}^{++} \cdots \text{CH}^+) \longrightarrow \cdots \longrightarrow \text{CH}^+$	CH_2, CH^+ déméthylé		$k_9 = 2,3 \cdot 10^9$ [12] $k'_9 = 3,0 \cdot 10^9$ [12]

de photoréduction, par rapport à celle qu'on a avec le BT seul, est complexe. Suivant les concentrations respectives nous avons observé une accélération ou un ralentissement.

- très peu de changement dans le spectre d'absorption du carotène. Dans certains cas nous avons observé une faible diminution de DO vers 450 nm, diminution qui n'atteint pas 10 % de la variation de DO du BT.

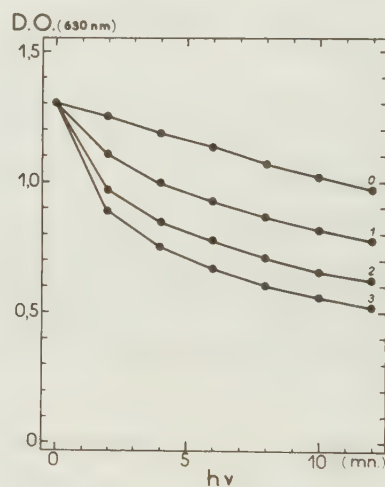
b) Milieu acide. Alors que l'éclairement du BT seul, en milieu acide, produit une photoréduction très lente (cf. figure 34), l'addition de carotène entraîne une accélération de la vitesse initiale de photoréduction (figure 41). L'addition de benzoquinone entraîne réversibilité partielle.

En milieu acide le spectre d'absorption du carotène est plus affecté qu'en milieu neutre. Ainsi en milieu HCl $5.10^{-3}N$ la diminution de DO à 450 nm peut atteindre le quart de la diminution de DO à 630 nm. Cette évolution du spectre du carotène peut être due pour une part à une isomérisation (catalyse acide), pour une part à des modifications irréversibles [189].



- Figure 40 -

Figure 40 - Spectre d'absorption d'un mélange de BT ($1,2.10^{-5}M$) et de carotène ($1,1.10^{-5}M$), dans l'éthanol (avec 1 % de benzène), avant et après éclaircissement (20 minutes ; $\lambda = 630 \text{ nm}$; 2 mW.cm^{-2}). Cuve 10 mm, sous vide.

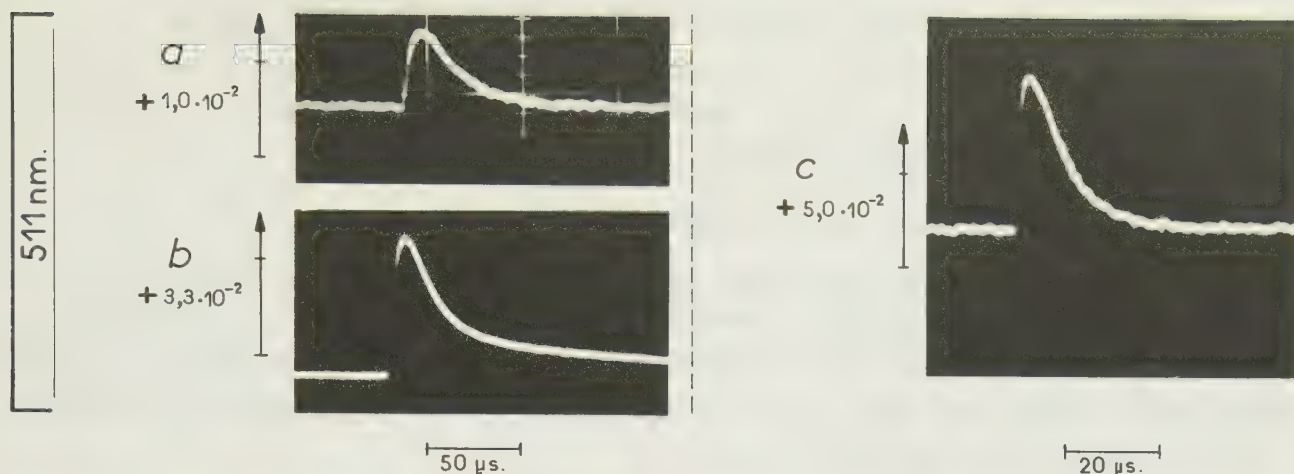


- Figure 41 -

Figure 41 - Evolution de la densité optique du BT (mesurée à 630 nm) sous l'effet d'un éclaircissement réalisé avec l'accessoire infra-rouge du spectrophotomètre Cary 14. Entre la lampe et la cuve sont interposés un filtre Calflex (coupure au-delà de 700 nm) et un filtre Schott OG5,3 mm (coupure en-deça de 540 nm). Cuves 10 mm, sous vide.

Cuve 0 : 0,15 ml d'une solution de BT dans l'éthanol + 2,05 ml d'éthanol + 0,2 ml de HCl $5.10^{-2}N$, dans l'éthanol + 0,2 ml d'hexane.

Cuves 1,2,3 : identique, mais hexane contenant des concentrations variables en carotène. Concentrations finales en carotène : 1 ($2.10^{-6}M$) . 2 ($6.10^{-6}M$) . 3 ($17.10^{-6}M$).



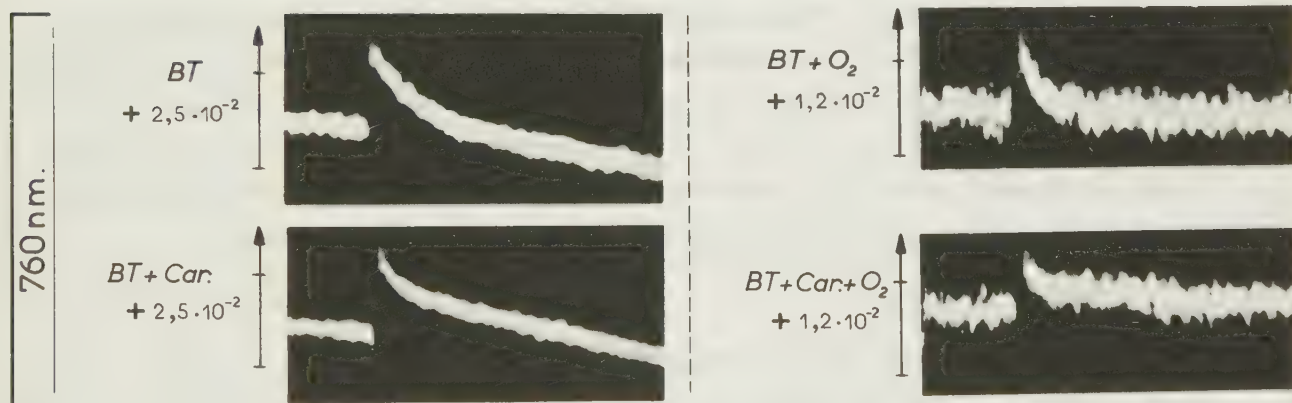
- Figure 42 -

Oscillogrammes montrant les augmentations de DO, à 511 nm, par excitation laser de solutions dans l'éthanol (+ 2 % de benzène). En ordonnée augmentation de DO. Cuve 10 mm; PM XP 1141 ; $R_c = 4 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$.

a : BT ($6,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) et Car ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)

b : BT ($5,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) et Car ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)

c : BT ($1,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) et Car ($8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)



- Figure 43 -

Oscillogrammes montrant les augmentations de DO (en ordonnée) à 760 nm, obtenues par excitation laser de solutions dans l'éthanol (+ 2 % de benzène). Cuves 10 mm, sous vide ou sous pression partielle d'air (marqués + O_2). PM XP 1141 - $R_c = 0,5 \text{ k}\Omega$ - $\Delta\lambda = 12 \text{ nm}$. Mêmes vitesse de balayage que D 13.

BT : $5,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de BT

BT + Car : $5,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de BT + $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de Car

BT + O_2 : $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de BT ; O_2 dissous : $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

BT + Car + O_2 = $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de BT + $4,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de Car ; O_2 dissous : $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

D.3.2 BT et carotène dans l'éthanol neutre : variations de densité optique

Les expériences décrites dans ce paragraphe ont été effectuées à 21 °C, en l'absence de toute addition : les cuves contiennent uniquement, en solution dans l'éthanol, du BT, du carotène, et un peu de benzène ou d'hexane.

D.3.2.1 Variations de densité optique entre 490 et 550 nm.

L'augmentation de DO vers 510 nm obtenue par excitation de BT en présence de carotène est beaucoup plus importante que celle qu'on obtient avec le BT seul dans les mêmes conditions. De plus les temps de montée et de décroissance sont nettement plus courts. Quelques signaux typiques sont présentés sur la figure 42. L'analyse quantitative des courbes est difficile ; citons quelques caractéristiques :

- le temps pour atteindre le maximum diminue quand on augmente la concentration en carotène.

- si le rapport des concentrations de carotène et de BT est supérieur à 5 et si $[\text{Car}] > 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, la décroissance suit correctement une exponentielle avec $t_{1/2} = 5 \mu\text{s}$ (figure 42c).

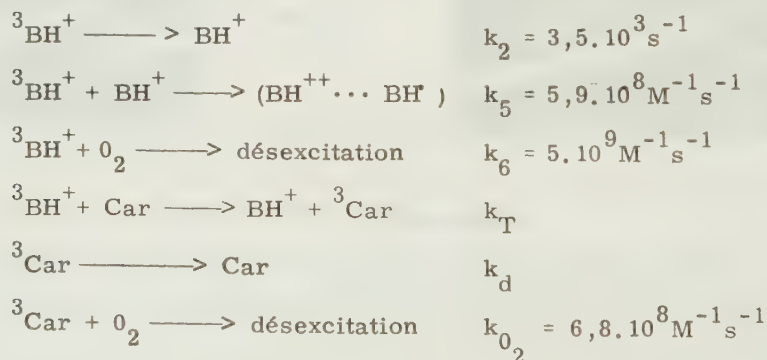
- aux fortes concentrations en BT, et si la concentration en carotène n'est pas dominante, la décroissance du signal est nettement complexe (figure 42b).

- ces caractères se retrouvent entre 490 et 540 nm. On observe une augmentation de DO maximale vers 513 nm.

- en présence de teneurs croissantes en oxygène on observe une diminution de l'amplitude de l'augmentation de DO, ainsi qu'une accélération de la cinétique de retour. Sous air le temps de montée n'est pas mesurable ($< 0,5 \mu\text{s}$) et pour la décroissance on a $t_{1/2} = 3,5 \mu\text{s}$. Dans l'hypothèse d'un composé décroissant avec $t_{1/2} = 5 \mu\text{s}$ et d'une réaction bimoléculaire avec O_2 , on obtient une constante de vitesse de réaction avec l'oxygène :

$$k_{\text{O}_2} = 6,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$

Les caractères précédents indiquent la formation de carotène triplet. On peut alors expliquer tous les signaux observés vers 520 nm par l'ensemble de réactions :



Si la durée de l'excitation est courte vis-à-vis des réactions (excitation laser) on part au temps zéro avec un peuplement maximal en $^3\text{BH}^+$ (soit B la concentration). Le schéma précédent donne alors, en posant $[^3\text{Car}] = y$ et $[\text{Car}] = C$ (C est pratiquement constant au cours des réactions)

$$[{}^3\text{BH}^+] = B e^{-kt} \quad \text{avec} \quad k = k_2 + k_5 [{}^3\text{BH}^+] + k_6 [{}^1\text{O}_2] + k_T C$$

si $k_T C \gg k_2 + k_5 [{}^3\text{BH}^+] + k_6 [{}^1\text{O}_2]$ on a :

$$[{}^3\text{BH}^+] = B e^{-k_T C t} \quad \text{et} \quad \frac{dy}{dt} = k_T C B e^{-k_T C t} - k_d y$$

$$\text{d'où} \quad y = \frac{k_T B C}{k_d - k_T C} \left[e^{-k_T C t} - e^{-k_d t} \right]$$

Les conditions précédentes se trouvent réunies pour le tracé de la figure 42c ; on trouve un bon accord entre le tracé et la formule précédente en prenant :

$$k_T = 5,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad \text{et} \quad k_d = 1,4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}, \quad \text{soit} \quad t_{1/2} = 5,0 \mu\text{s}$$

Les valeurs de k_T et k_d sont obtenues par tâtonnement, en faisant une suite d'essais jusqu'à ce que l'on trouve un accord entre la courbe théorique et la courbe expérimentale (agrandie par épidiastroscope). On peut comparer les valeurs précédentes avec celles qui ont été obtenues avec la chlorophylle dans l'hexane ($k_T = 4,6 \cdot 10^9$, et $k_d = 1,5 \cdot 10^5$; paragraphe C.2.2).

Pour $C = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et $[{}^3\text{BH}^+]$ variant de $7 \cdot 10^{-6}$ à $6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ nous n'avons pas trouvé de variation dans les valeurs de k_d ; cela exclut la possibilité d'une réaction de ${}^3\text{Car}$ avec BH^+ . On voit aussi que le transfert d'énergie est très rapide. Ce résultat était attendu car l'énergie de ${}^3\text{BH}^+$ est de $39 \text{ kcal.mole}^{-1}$ ce qui est supérieur à celle de l'état triplet de la chlorophylle et donc bien supérieur au niveau de ${}^3\text{Car}$. La faible valeur de k_{0_2} sera discutée au paragraphe E.

D.3.2.2 Variations de densité optique entre 700 et 1000 nm

a) Observations à 760 nm

L'augmentation de DO observée à 760 nm en spectroscopie par éclairs, avec du BT dans l'éthanol, est attribuée à ${}^3\text{BH}^+$. On sait aussi qu'une forme semi-réduite absorbe à cette longueur d'onde. Par excitation laser on observe une décroissance exponentielle (figure 43). En présence de carotène la décroissance est biphasique : il y a une phase rapide dont le $t_{1/2}$ diminue quand augmente la teneur en carotène. En même temps la phase lente ($t_{1/2} > 100 \mu\text{s}$) est de plus en plus importante.

En présence de teneurs croissantes en oxygène on constate une diminution du $t_{1/2}$ de la phase rapide et de l'amplitude de la phase lente dont la cinétique de décroissance paraît peu affectée.

Ces résultats peuvent s'interpréter par une désexcitation de ${}^3\text{BH}^+$ par le carotène et l'apparition d'un produit autre que ${}^3\text{Car}$, et qui ne réagit pas avec l'oxygène.

b) Observation plus détaillée de la phase lente

- Spectre d'absorption.

Le spectre de ΔDO correspondant à la phase lente est tracé sur la figure 44 ; il présente un maximum bien défini à 910 nm. Rappelons que le carotène et le BT n'ont pas de bande d'absorption dans cette région.

- Temps de montée.

Nous avons mesuré le temps de demi-montée ($t_{1/2}$ = temps, après l'éclair laser, où l'augmentation de densité optique atteint la moitié de sa valeur maximale). On trouve 21 μs pour $5,7 \cdot 10^{-6} M$ de carotène. Ce temps diminue quand augmente la concentration en carotène ; nous n'avons pas pu faire de mesure précise à cause d'un parasite lumineux dû au laser.

- Influence de la concentration en carotène sur la variation de DO maximale.

La variation de DO maximale augmente avec la teneur en carotène. On atteint une ΔDO limite que l'on peut comparer à la variation obtenue avec le BT seul dans les mêmes conditions :

$$\Delta DO (910 \text{ nm, carotène}) \text{ limite} \sim 3 \times \Delta DO (830 \text{ nm, } {}^3BH^+)$$

Pour une concentration en BT de $1,6 \cdot 10^{-5} M$ on atteint la demi-saturation avec une concentration de $4 \cdot 10^{-6} M$ de carotène.

- Cinétique de décroissance.

La décroissance du signal se fait suivant une loi exponentielle, avec un $t_{1/2}$ assez variable d'une manipulation à l'autre : $t_{1/2} = 200 \pm 100 \mu s$.

c) Expériences avec la zéaxanthine

Avec la zéaxanthine on a la même phase lente. Le spectre de différence est pratiquement le même qu'avec le carotène (figure 44), mais le temps de vie est nettement plus long : $t_{1/2} \sim 500$ à $800 \mu s$.

D.3.2.3. Variations de densité optique entre 340 et 490 nm

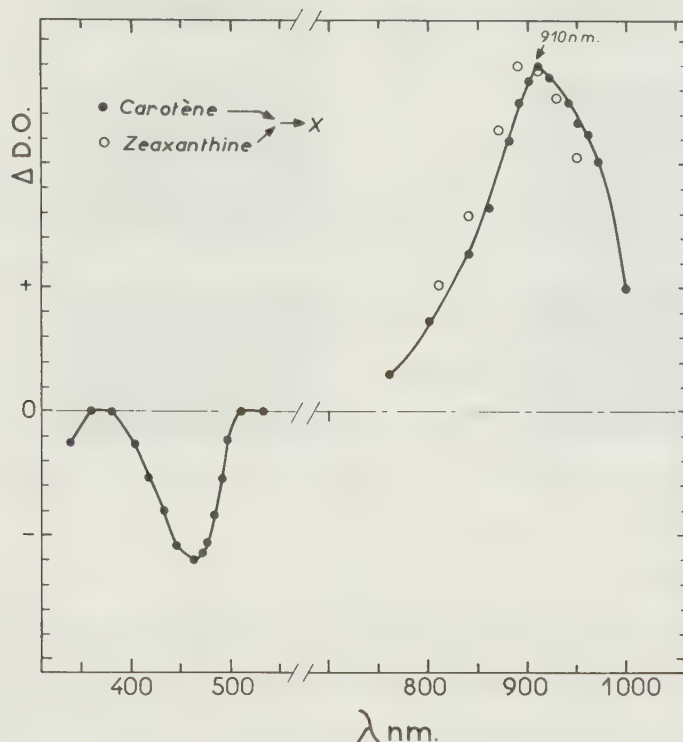
Dans cette zone de longueurs d'onde les signaux obtenus en spectroscopie par éclairs par excitation laser, sont assez complexes (figure 45). Ils sont caractérisés principalement par une diminution de DO à retour lent. Cette diminution ne peut être due au BT qui n'absorbe pas dans cette région ; elle est donc due au carotène qui se transforme en un composé que nous désignerons par X pour simplifier l'écriture.

La diminution de DO est réversible : $X \rightarrow \text{Car}$. On s'assure que l'on réobtient le carotène car, après un éclaircissement continu sous vide, le spectre d'absorption du carotène est très peu modifié (figure 40). La cinétique de retour, approximativement exponentielle, est la même aux trois longueurs d'onde que nous avons essayées : 417, 462 et 491 nm. On trouve $t_{1/2} = 200 \mu s$, le même qu'à 910 nm, avec les mêmes fluctuations.

Le spectre de différence correspondant au peuplement de X est représenté sur la figure 44. Ce spectre montre une disparition de l'absorption du carotène.

La cinétique de montée, entre 400 et 490 nm, semble varier avec la longueur d'onde (comparer par exemple 417 et 462 nm sur la figure 45). En fait on observe toujours une phase primaire due à ${}^3BH^+$; de plus nous n'avons jamais pu nous placer dans le cas simple

où $[\text{Car}] > [\text{BT}]$ car l'absorption de la lumière d'analyse par le carotène est rapidement excessive.



- Figure 44 -

Spectre de différence de la variation de DO à cinétique de retour lente ($X, t_{1/2} \sim 200 \mu s$) obtenue par excitation laser d'un mélange de BT et de carotène (ou de zéaxanthine), dans l'éthanol, sous vide. Les courbes correspondant au carotène et à la zéaxanthine ont été normalisées pour une même valeur au maximum (910 ou 890 nm). $R_c = 3k\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$.

- Zéaxanthine ($2,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) + BT ($1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), dans l'éthanol pur.

PM 56 CVP - on obtient $\Delta DO_{890 \text{ nm}} = 2,8 \cdot 10^{-2}$.

- Carotène ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) + BT ($1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), dans l'éthanol + 2 % de benzène.

$\lambda < 600 \text{ nm}$: PM XP 1141

$\lambda > 700 \text{ nm}$: PM 56 CVP.

L'accord quantitatif entre les résultats donnés par les deux PM est vérifié par des mesures effectuées à 462 et 481 nm avec le PM 56 CVP (l'accord est à $\pm 20 \%$). Au maximum on a : $\Delta DO_{910 \text{ nm}} = 3,1 \cdot 10^{-2}$.

D.3.2.4. Variations de DO à 603 nm

A 603 nm la variation de DO initiale, après un éclair laser, est la même avec le BT seul ou en présence de carotène. Nous l'attribuons à la formation de $^3\text{BH}^+$. Avec le BT seul le retour est grossièrement monophasique ($t_{1/2}$: 200 à 300 μs) ; en fonction de ce qui a été vu au paragraphe D.2.3 ce retour est en fait complexe : désexcitation de $^3\text{BH}^+$, formation puis disparition du dimère par transfert de charge. En présence de carotène la cinétique de retour est clairement biphasique (figure 46) : phase rapide dont le $t_{1/2}$ diminue quand augmente la concentration en carotène, et phase très lente dont nous ne pouvons étu-

dier la cinétique ($t_{1/2} > 1$ ms).

D.3.2.5 Bilan . L'étude en spectroscopie par éclairs de solutions de BT et de carotène dans l'éthanol, en l'absence de toute autre addition, permet de mettre en évidence trois types de cinétique de retour de ΔDO :

- une cinétique rapide que nous avons attribuée à l'état triplet du carotène.
- une cinétique lente que l'on trouve pour l'augmentation de DO vers 910 nm comme pour la diminution de DO dans la bande d'absorption du carotène. C'est donc probablement le composé X qui absorbe à 910 nm.
- une cinétique très lente pour une diminution de DO vers 600 nm, qui ne peut traduire que la formation d'un produit d'évolution du BT.

D.3.3 Influence de différents facteurs

Dans ce paragraphe nous décrivons l'influence, sur les réactions observées en spectroscopie par éclairs avec le mélange BT + carotène, de quelques paramètres : température, concentration en réducteur, pH.

D.3.3.1 Température

Nous avons étudié l'effet de la température sur la phase lente, à 462 nm, en excitant avec un tube éclair une solution éthanolique de BT ($1,4 \cdot 10^{-5}$ M) et de carotène ($0,8 \cdot 10^{-5}$ M). La solution dégazée était contenue dans un tube à essai Φ 10 mm, plongé dans un vase de Dewar rempli d'éthanol refroidi à l'azote liquide. Les résultats suivants ont été obtenus :

température (°C) :	- 80	- 46	- 15	+ 9	+ 21
ΔDO (462 nm) $\times 10^2$:	+ 0,11	- 0,17	- 0,35	- 0,83	- 0,83
$t_{1/2}$ retour (μ s) :	150	600	600	500	300

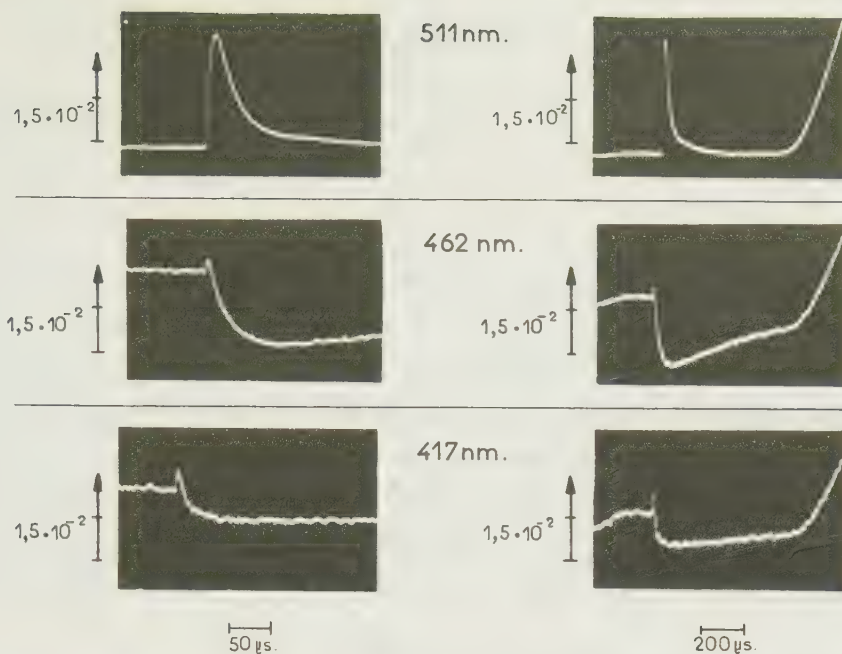
L'augmentation de DO, à -80° , est probablement due à la forme $^3BH^+$ ($t_{1/2}$ plus court et signal inversé). La viscosité du milieu doit ralentir considérablement la réaction de $^3BH^+$ avec le carotène.

D.3.3.2 Concentration en réducteur

En présence de paraphénylène diamine (PPDA) la durée de vie de X est diminué. Cette observation n'est possible qu'en présence de très faibles concentrations en PPDA. En effet ce composé attaque $^3BH^+$ pour le réduire en BH^+ suivant une réaction pratiquement contrôlée par la diffusion (paragraphe D.2.3.2a). Pour que cette réaction soit négligeable il faut que la concentration en PPDA soit nettement inférieure à la concentration en carotène. Avec des concentrations en PPDA comprises entre 10^{-6} et $5 \cdot 10^{-6}$ M, on peut interpréter l'accroissement de la vitesse de réapparition du carotène, mesurée à 417 et à 462 nm, par la réaction :



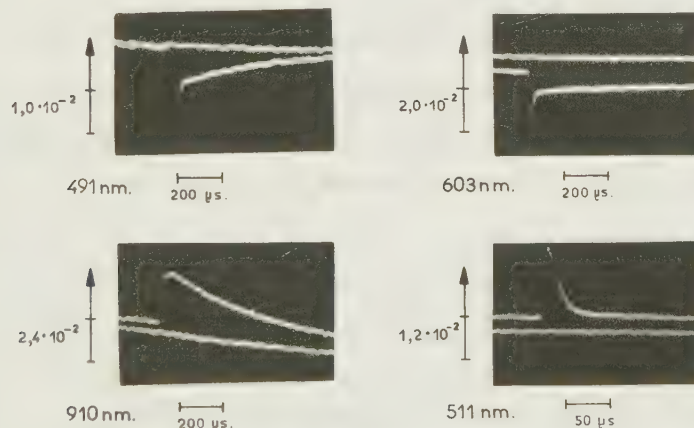
L'allylthiourée (ATU), à une concentration de $5 \cdot 10^{-2}$ M, n'a pas d'action sur le $t_{1/2}$ de X, mais l'amplitude de ΔDO est réduite d'un facteur 4 environ (pour une concentration en carotène de $1,3 \cdot 10^{-5}$ M). Par contre si, en présence de 10^{-3} M d'ATU, on éclaire le milieu



- Figure 45 -

Oscillogrammes montrant les variations de DO obtenues par excitation laser d'une solution dégazée de BT ($2,3 \cdot 10^{-5}$ M) et de carotène ($1,2 \cdot 10^{-5}$ M) dans l'éthanol + 2 % de benzène. Cuve 10 mm.

PM XP 1141; $R_c = 9 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$. La remontée sur la droite des tracés de droite correspond au flanc du créneau de lumière d'analyse.



- Figure 46 -

Oscillogrammes montrant les variations de DO obtenues par excitation laser d'une solution dégazée de BT ($1,15 \cdot 10^{-5}$ M) et de carotène ($2,25 \cdot 10^{-5}$ M) dans l'éthanol + 2 % de benzène. Cuve 10 mm.

PM 56 CVP; $R_c = 3 \text{ k}\Omega$; $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$.

en continu de façon à transformer une partie du BT en BH_2 , la durée de vie de X est diminuée. Une concentration de $3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ de BH_2 suffit pour faire passer $t_{1/2}$ de 250 à 40 μs .

La concentration en BT semble diminuer le temps de vie de X. Toutefois l'effet est faible et on ne peut pas exclure un effet du BH_2 formé au cours du dégazage et des manipulations.

D.3.3.3. Influence du pH

a) Généralités. Les variations d'absorption observées avec le BT et le carotène sont fortement influencées par le pH. Celui-ci a été déterminé par addition de NaOH ou de HCl. Dans l'éthanol les propriétés acido-basiques sont assez voisines de celles de solutions aqueuses. Pour les additions de HCl le pH a été calculé en considérant HCl comme un acide faible (son pK est de 2,1). Pour les additions de NaOH le calcul a peu de sens du fait du pouvoir tampon du BT conféré par l'équilibre $\text{BH}^+ \rightleftharpoons \text{B} + \text{H}^+$ dont le pK est de l'ordre de 13 (on a approximativement $\text{pK}_{\text{éthanol}}^{\text{B}} = 1 + \text{pK}_{\text{eau}}^{\text{B}}$). Nous avons estimé entre 12 et 13 le pH obtenu par addition de $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de NaOH : en effet il y a un peu moins de la moitié du BT sous forme de B.

Les additions suivantes ont été utilisées :

Addition (M) :	NaOH $4 \cdot 10^{-5}$	rien	HCl 10^{-4}	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	10^{-2}
pH approximatif :	12 à 13	9,5	4,0	3,6	3,0	2,2

Nous n'avons pas tenu compte de la perturbation que peut amener la présence d'un peu de benzène ou d'hexane. De plus l'absence de tampon pH ne permet pas de considérer les valeurs ci-dessus autrement que comme des ordres de grandeur.

Rappelons que le carotène est peu stable en milieu acide [189]. Par contre nous n'avons pas observé de changement du spectre d'absorption de la zéaxanthine, même aux plus fortes acidités que nous ayons utilisées.

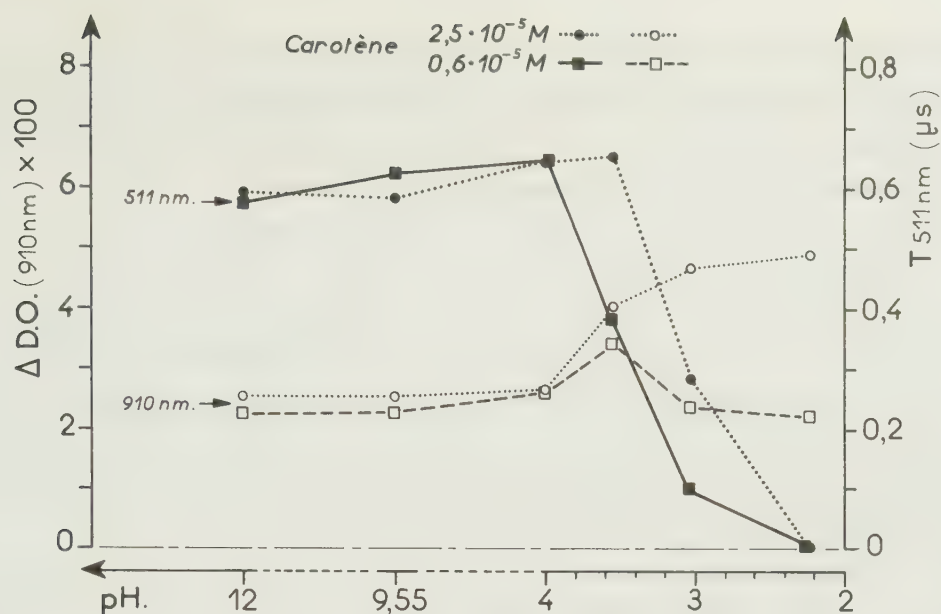
b) Influence du pH sur les variations de DO vers 510 nm.

La demi-vie de l'état triplet du carotène, que l'on peut mesurer à 511 nm, n'est pas affectée de façon notable par le pH. Toutefois les mesures sont peu précises à pH acide du fait de la petitesse des signaux. En milieu neutre le $t_{1/2}$ est de $5,0 \pm 0,3 \mu\text{s}$, et il est compris entre 4 et 6 μs à pH 2,2.

Pour apprécier la quantité de ^3Car formé à différents pH nous avons mesuré la surface du signal de variation d'absorption à 511 nm, et obtenu la quantité T comme il est indiqué au paragraphe B.1.3d ($T = \epsilon \tau C$, où ϵ est le coefficient d'extinction de ^3Car à 511 nm, τ sa durée de vie et C sa concentration maximale ramenée au cas d'un peuplement instantané).

Les résultats obtenus dans différentes conditions sont reportés sur les figures 47, 48 et 49. On voit que dans tous les cas étudiés (différentes concentrations en carotène, teneurs différentes en hexane, cas de la zéaxanthine), la valeur de T, approximativement constante aux pH supérieurs à 4, chute ensuite rapidement pour atteindre une valeur souvent non mesurable à pH 2,2. La figure 47 montre que la concentration en carotène influe peu sur la valeur de T aux pH neutres, mais la chute se fait à des pH moins acides quand la concentration en carotène est faible. Ce point est confirmé par la figure 49, avec la zéaxanthine.

Puisque la durée de vie n'est pratiquement pas affectée par le pH les remarques précédentes s'appliquent également aux quantités de caroténoïdes triplets formées dans les différents cas.

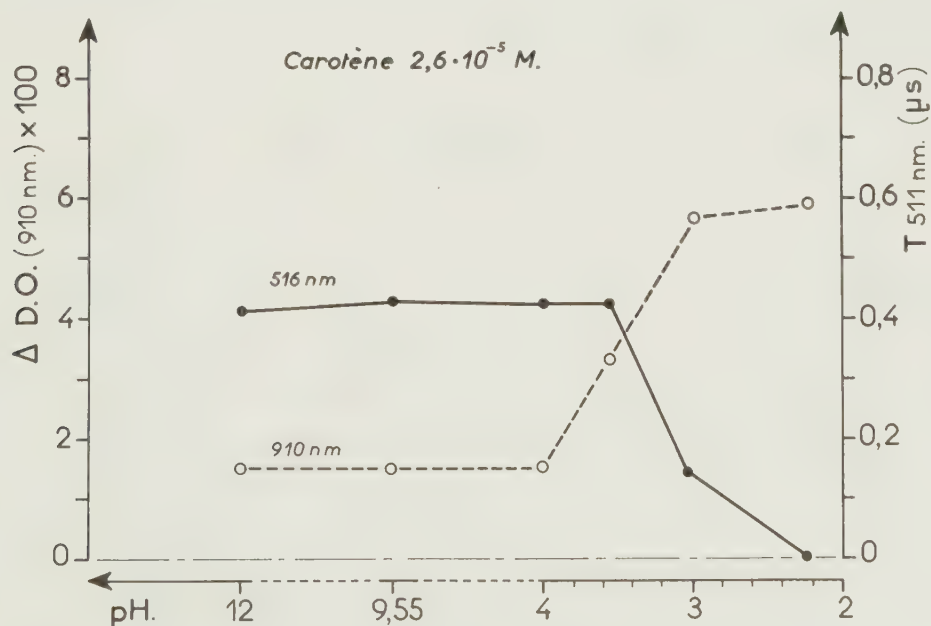


- Figure 47 -

Influence du pH sur la variation de DO à 910 nm, et sur la quantité T mesurée à 511 nm ($T = \epsilon \tau C$).

Les variations de DO sont obtenues par excitation laser de cuves dégazées contenant des solutions, dans l'éthanol, de BT ($1,35 \cdot 10^{-5}$) et de carotène ($2,5$ et $0,6 \cdot 10^{-5}$ M). 10 % d'hexane. Le pH a été déterminé comme il est indiqué au paragraphe D.3.3.3a.

PM 56 CVP - $R_c = 3 \text{ k}\Omega$ à 910 nm et $1 \text{ k}\Omega$ à 511 nm - $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$.



- Figure 48 -

Mêmes éléments que pour la figure 47, sauf que la teneur en hexane est de 35 % (il en résulte que le pH calculé est moins valable).

Concentration en carotène $2,6 \cdot 10^{-5}$ M.

L'examen détaillé des signaux montre que, après la phase rapide attribuée à ^3Car , il subsiste une variation de DO à retour lent, de faible amplitude : augmentation de DO aux pH neutres ou basiques, diminution de DO aux pH acides. Nous n'avons pas plus étudié cet effet, qui peut représenter 10 % de la phase rapide.

c) Influence du pH sur les variations de DO à retour lent.

- Amplitude de ΔDO à 910 nm.

L'amplitude de la variation de DO à 910 nm en fonction du pH est reportée sur les figures 47, 48 et 49, dans différentes conditions. Aux pH supérieurs à 4 celle-ci est constante, et elle varie peu avec la concentration en carotène ou en zéaxanthine. Aux pH inférieurs à 4 on observe une augmentation brutale aux fortes concentrations en caroténoïdes ; aux faibles concentrations il y a plutôt une diminution ; l'allure de la courbe n'est pas simple dans le cas de la figure 47, avec $0,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de carotène.

- Cinétiques de retour

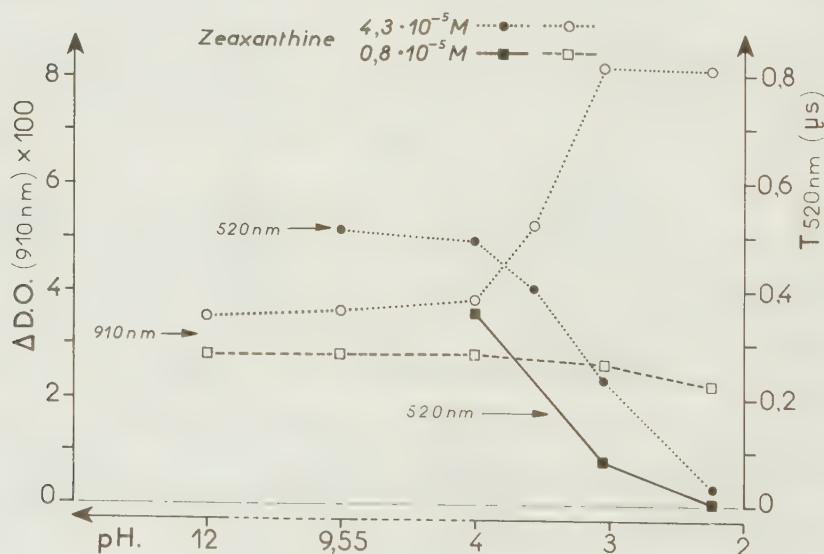
Dans la gamme de pH étudiée la cinétique de retour, à 910 nm, est exponentielle. Le $t_{1/2}$ est fonction du pH ; les valeurs suivantes ont été obtenues :

pH :	12	9,5	3,0
$t_{1/2} (\mu s)$:	70 ± 30	200 ± 100	> 1000

Le même effet de pH est observé à 462 nm, et les valeurs de $t_{1/2}$ sont toujours très voisines. Par contre nous n'avons pu déceler aucun effet du pH sur le retour de la diminution de DO à 603 nm : dans tous les cas le $t_{1/2}$ est supérieur à 1 ms.

- Remarques

Nous avons vérifié que le spectre de différence de X, aux environs de 910 nm, est le même en milieu acide qu'en milieu neutre.



- Figure 49 -

Mêmes éléments que pour la figure 47, sauf que la zéaxanthine ($4,3$ et $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) remplace le carotène. Ethanol sans hexane.

A 603 nm, l'excitation de BT seul à pH 3,0 ne permet de déceler aucune diminution de DO de longue durée. En présence de carotène la diminution de DO de longue durée est environ le quart de l'augmentation de DO à 910 nm.

Le $t_{1/2}$ de retour à 910 nm est plus long pour la zéaxanthine que pour le carotène : environ 600 μ s en milieu neutre.

D.4 INTERPRETATION ET DISCUSSION

D.4.1 Problèmes posés

A l'examen des résultats expérimentaux il ne nous semble pas faire de doute que le carotène réagit avec l'état triplet $^3\text{BH}^+$, comme le montrent la diminution de la demi-vie de $^3\text{BH}^+$ en présence de carotène ainsi que la suppression progressive du produit de la réaction de $^3\text{BH}^+$ avec BH^+ à mesure qu'on augmente la concentration en carotène. De même ne nous semble-t-il pas faire de doute que la réaction précédente entraîne la formation de l'état triplet du carotène : ce transfert d'énergie ne pose pas de problèmes particuliers du fait des niveaux d'énergie respectifs des deux états triplets (paragraphe D.3.2.1).

Les problèmes essentiels nous semblent être posés par le produit appelé X : mode de formation, nature et mode d'évolution. Il est quand même possible de donner tout de suite deux caractéristiques :

- X est un produit d'évolution du carotène et il redonne finalement du carotène comme l'attestent les cinétiques d'évolution de DO dans la bande d'absorption du carotène (paragraphe D.3.2.3).

- La formation de X nécessite la diffusion de molécules comme l'indiquent l'influence de la concentration en carotène sur la vitesse de formation (paragraphe D.3.2.2b), ainsi que l'effet de la température sur la quantité de X formée (D.3.3.1). Des expériences non décrites, avec comme solvant des mélanges éthanol-cyclohexanol, ont aussi montré que la formation de X était ralentie en milieu visqueux. Par ailleurs les spectres d'absorption des mélanges BT-carotène dans l'éthanol ne donnent aucune indication d'une association entre ces molécules à l'état fondamental.

Avant d'envisager les différentes possibilités concernant le composé X, il nous faut faire l'hypothèse que celui-ci est unique. Cela est raisonnable du fait de la constance du spectre de différence (figure 44) ; toutefois ni ce spectre ni aucune cinétique de formation n'ont pu être déterminé avec précision. De plus les cinétiques apparentes de formation varient avec la longueur d'onde d'analyse entre 400 et 490 nm (paragraphe D.3.2.3) ; ces variations ne sont quand même pas incompatibles avec l'hypothèse de l'unicité de X car elles peuvent provenir, entre autres, de $^3\text{BH}^+$ ou de ^3Car . La décroissance purement exponentielle des variations d'absorption (paragraphe D.3.3.3c) est aussi en faveur de l'hypothèse retenue.

D.4.2 Hypothèses non retenues, sur la nature ou le mode de formation de X

D.4.2.1 X ne provient pas de ^3Car

En premier lieu on peut dire que X ne provient pas de l'évolution de ^3Car seul car on n'en observe par de trace par excitation du mélange chlorophylle A - carotène dans l'éthanol. Par ailleurs, avec le BT, la demi-vie de ^3Car est indépendante des concentrations

en BT et en H^+ , dans les zones de concentrations étudiées (paragraphe D.3.2.1 et D.3.3.3b) ce qui exclut une réaction entre 3Car et le BT ou les protons.

D.4.2.2 X n'est pas un isomère du carotène

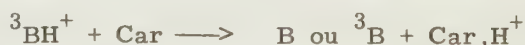
A notre connaissance il n'a jamais été trouvé de bande d'absorption vers 900 nm pour aucun isomère du carotène. Cela serait d'ailleurs en contradiction avec les théories des spectres d'absorption des polyènes.

D.4.2.3. Complexe Car-BT, de type transfert de charge

Le carotène est capable de former des complexes de type transfert de charge avec des accepteurs d'électrons (iode-cf paragraphe A.2.1 ; certaines argiles, etc...). Cet aspect sera plus détaillé au paragraphe E.2.2. Sur le plan expérimental il faut remarquer que les variations de DO à 603 nm (BT) et à 910 nm (X) décroissent suivant des cinétiques très différentes (paragraphe D.3.3.3c). Cela signifie que, une fois formés, le composé X et le produit d'évolution du BT suivent des chemins différents et ne constituent donc pas un seul et même complexe. En outre une telle hypothèse ne permet pas de rendre compte simplement de l'accélération de la photoréduction du BT en présence de carotène, en milieu acide.

D.4.2.4. Protonation du carotène

En milieu très acide la bande d'absorption du carotène est déplacée jusque vers 960 nm [175], c'est à dire très près du pic d'absorption de X. L'hypothèse d'une protonation du carotène serait en outre en accord avec la plus courte durée de vie de X en milieu basique, et avec son peuplement plus important en milieu acide (D.3.3.3c). Comme il a été montré plus haut que 3Car ne réagissait pas avec les protons, une telle protonation ne peut se faire que par transfert de proton :



ou



La première réaction produit la forme non protonée du BT, caractérisée par bande d'absorption à 540 nm (figure 31). Si cette forme redonne rapidement BH^+ , la diminution de DO à 603 nm sera rapidement réversible ; sinon on pourra observer à 540 nm une augmentation de DO de même ordre de grandeur et de même durée de vie que la diminution de DO à 603 nm. En fait aucune de ces deux possibilités ne correspond aux résultats expérimentaux : le retour à 603 nm est lent, et on n'observe à 540 nm aucune augmentation de DO de longue durée de vie ($\Delta DO_{540} < 0,1 \times \Delta DO_{603}$).

La seconde réaction redonnerait immédiatement BH^+ . Il n'y aurait donc pas de ΔDO de longue durée de vie à 603 nm, ce qui est également contraire aux observations.

C'est sur ces arguments que nous avons éliminé l'hypothèse d'une protonation du carotène. Par ailleurs le carotène protoné n'est observé que dans des solutions plusieurs fois molaires d'acide trichloracétique ou d'acide sulfurique, dans le benzène [175]. Cette espèce serait probablement très instable dans l'éthanol neutre. L'hypothèse de la protonation ne rendrait pas compte non plus de l'accélération de la photoréduction du BT en présence de carotène, en milieu acide.

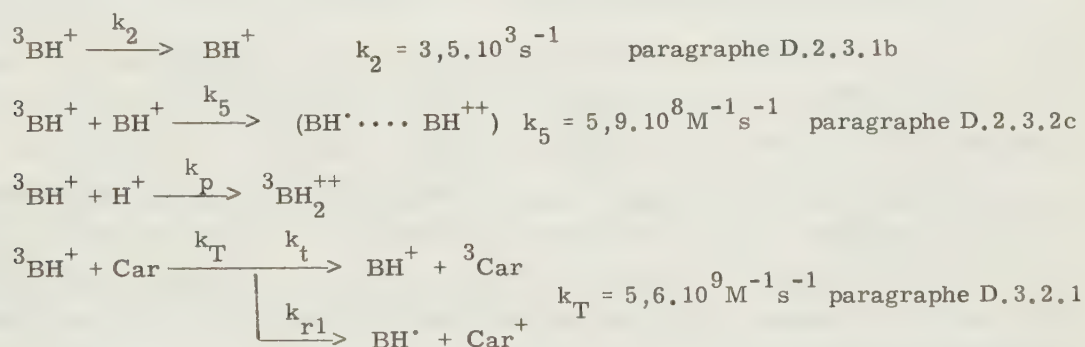
D.4.3 Explication proposée : $X = \text{Car}^+$

D.4.3.1 Les résultats obtenus sur la photoréduction du BT lors d'un éclairage continu en présence de carotène nous ont amené à penser que le carotène se comportait comme un réducteur. En effet il est pratiquement certain que la photoréduction se fait à partir de l'état triplet du BT. Le fait que le carotène, bien que réagissant très rapidement avec $^3\text{BH}^+$, change peu la vitesse de photoréduction en milieu neutre et même l'accélère en milieu acide, conduit à faire l'hypothèse que la réaction avec $^3\text{BH}^+$ produit la forme semi-réduite. Cette réduction du BT doit s'accompagner d'une oxydation du carotène ; comme l'étape primaire de la réduction est le transfert d'un électron, nous avons fait l'hypothèse que X représentait une molécule de carotène ayant perdu un électron (ion-radical), soit : $X = \text{Car}^+$.

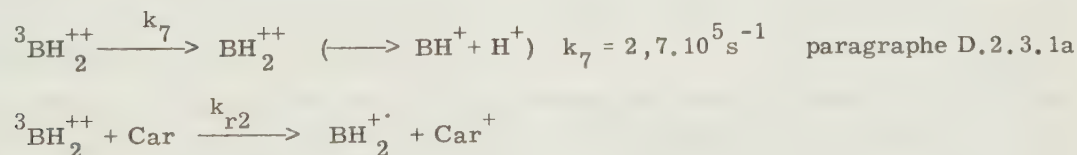
Cette hypothèse est celle qui rend le mieux compte de l'ensemble de nos résultats. On peut expliquer la quasi-totalité de ces derniers par le schéma réactionnel suivant ; on part de l'état $^3\text{BH}^+$ et on néglige certaines réactions qui figuraient dans le tableau du paragraphe D.2.4.

D.4.3.2 Schéma réactionnel

- Réactions de $^3\text{BH}^+$:



- Réactions de $^3\text{BH}_2^{++}$:



Sur ce schéma nous avons omis les réactions des produits : $(\text{BH}^{\cdot} \dots \text{BH}^{++})$, $\text{BH}^{\cdot}$, $\text{BH}_2^{+\cdot}$, ^3Car , Car^+ . La réaction de $^3\text{BH}^+$ avec les protons (en fait les protons sont solvatés par l'éthanol) est considérée comme irréversible étant donnée la courte durée de vie de $^3\text{BH}_2^{++}$. La constante de vitesse de protonation k_p n'est pas connue.

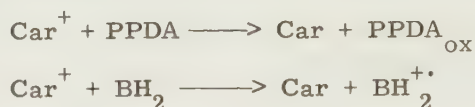
Nous avons supposé que la réaction de $^3\text{BH}^+$ avec le carotène donnait lieu à un transfert d'énergie ou à un transfert de charge, avec des probabilités respectives proportionnelles à k_t et à k_{r1} . Par contre la réaction de $^3\text{BH}_2^{++}$ avec le carotène donne lieu uniquement au transfert de charge. Cette différence est en accord avec les propriétés connues des colorants thiaziniques ; l'état triplet monoprotone a une énergie plus grande qui permet un transfert, tandis que l'état triplet biprotone est très facilement réduit.

D.4.3.3 Confrontation du schéma réactionnel avec les résultats expérimentaux

a) Le schéma précédent rend compte de l'effet du carotène sur la photoréduction du BT en éclaircissement continu : accélération en milieu acide, effet complexe en milieu neutre, suivant la vitesse des réactions de ${}^3\text{BH}^+$ avec BH^+ et avec Car, et suivant leur efficacité de photoréduction.

La formation de BH^+ et BH_2^{+} lors des réactions de transfert de charge permet d'expliquer la diminution de DO dans le pic d'absorption du BT ; ces formes semi-réduites seraient à l'origine de la formation de BH_2 , suivant des réactions qui sont lentes dans nos conditions expérimentales (la concentration en forme semi-réduite ne dépasse jamais 4.10^{-7}M).

b) Avec les hypothèses précédentes on peut interpréter la diminution du temps de vie de X en présence de réducteurs (PPDA, BH_2) comme une réduction de Car^+ pour redonner le carotène :



c) Discussion des effets du pH.

Ces effets, reportés sur les figures 47, 48 et 49 concernent la quantité de Car^+ formée (ΔDO 910 nm) et la quantité de caroténoïde triplet formée (T 511 nm pour le carotène, T 520 nm pour la zéaxanthine), après excitation par un éclair laser.

Tant que $k_T [\text{Car}] \gg k_p [\text{H}^+]$, le schéma prévoit que les deux paramètres mesurés seront indépendants du pH, et faiblement dépendants de la concentration en carotène (dans tous les cas nous avons eu $k_T [\text{Car}] \gg k_2 + k_5 [\text{BH}^+]$; par la suite nous négligerons ces deux dernières réactions). On retrouve bien cette indépendance du pH, entre pH 13 et pH 4, sur les figures 47, 48 et 49.

Quand la quantité $k_p [\text{H}^+]$ n'est plus négligeable, le schéma prévoit une diminution de T, diminution progressive quand diminue le pH. Par contre il est difficile de faire des prévisions sur l'évolution du Car^+ formé ; on peut s'attendre à ce qu'il n'y ait plus parallélisme entre l'évolution des deux paramètres, et à ce que les effets de la concentration en carotène deviennent plus importants ; si l'on suppose que $k_{r2} \sim k_T$, la vitesse de formation de Car^+ , proportionnelle à $k_{r2} [\text{Car}]$ est en compétition avec la désexcitation de ${}^3\text{BH}_2^{++}$ avec la constante de vitesse k_7 . On a égalité de vitesse entre les deux réactions pour $[\text{Car}] = 4.3.10^{-5}\text{M}$. Aux fortes concentrations en carotène le schéma prévoit que la formation de Car^+ sera plus grande en milieu acide qu'en milieu basique car $k_{r2} > k_{r1}$; on peut prévoir l'inverse à faible concentration en carotène : celui-ci est capable de réagir avec ${}^3\text{BH}^+$, dont la décroissance est lente, mais pas avec ${}^3\text{BH}_2^{++}$ dont la décroissance est très rapide.

Les courbes permettent d'estimer k_p . En effet on aura, en fonction du pH,

$T = 1/2 T_{\text{max}}$ pour $k_p [\text{H}^+] = k_T [\text{Car}]$. Nous avons trouvé des valeurs comprises entre 1,6 et $2.6.10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. On prendra $k_p = 2 \pm 1.10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

d) Estimations de k_t , k_{r1} , k_{r2} et du coefficient d'extinction de Car^+ à 910 nm.

Dans ce qui suit nous n'explicitons pas à chaque fois les unités : constantes de vitesse en s^{-1} ou en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, T en secondes ; la cuve de mesure fait toujours 1 cm, d'où $\text{DO} = \epsilon \times \text{concentration}$.

Pour calculer k_t , k_{r1} et $\epsilon(\text{Car}^+, 910 \text{ nm}) = y$, nous disposons des relations suivantes :

$$k_t + k_{r1} = k_T = 5,6 \cdot 10^9 \quad (1)$$

Nous avons mesuré que, à pH neutre, et à des concentrations en carotène saturantes, on avait : $\Delta \text{DO}(\text{Car}^+, 910 \text{ nm}) = 3$. $\Delta \text{DO}({}^3\text{BH}^+, 830 \text{ nm})$ paragraphe D.3.2.2b. Comme dans ces conditions tout le ${}^3\text{BH}^+$ formé réagit avec le carotène, pour donner Car^+ dans une pro-

portion $\frac{k_{r1}}{k_T}$, on peut écrire :

$$y = 3 \times \epsilon({}^3\text{BH}^+, 830 \text{ nm}) \times \frac{k_T}{k_{r1}}$$

Avec $k_T = 5,6 \cdot 10^9$ et $\epsilon({}^3\text{BH}, 830 \text{ nm}) = 11\,100$ (paragraphe D.2.3.1b)

on obtient la relation :

$$y \times k_{r1} = 1,9 \cdot 10^{14} \quad (2)$$

A pH neutre et à des concentrations de carotène saturantes, on a les relations suivantes :

$$\Delta \text{DO}(910 \text{ nm}) = y \times [\text{Car}^+]$$

$$T = \epsilon({}^3\text{Car}, 511 \text{ nm}) \times \tau({}^3\text{Car}) \times [{}^3\text{Car}]$$

$\frac{\Delta \text{DO}(910 \text{ nm})}{T}$ peut être mesuré sur les courbes des figures 47, 48 et 49. On trouve un rapport voisin de $3,9 \cdot 10^4$.

De plus on a la relation :

$$\frac{[\text{Car}^+]}{[{}^3\text{Car}]} = \frac{k_{r1}}{k_t}$$

En prenant $\epsilon({}^3\text{Car}, 511 \text{ nm}) = 160\,000$ ($\pm 25\%$) (paragraphe C.2.2), $\tau({}^3\text{Car}) = \frac{5 \cdot 10^{-6} \text{ s}}{0,69}$

on obtient finalement :

$$\begin{aligned} \frac{\Delta \text{DO}(910 \text{ nm})}{T} &= 3,9 \cdot 10^4 \\ &= \frac{y}{\epsilon({}^3\text{Car}, 511 \text{ nm}) \times \tau({}^3\text{Car})} \times \frac{k_{r1}}{k_t} = \frac{y \times k_{r1} \times 0,69}{0,8 \times k_t} \end{aligned} \quad (3)$$

La résolution des trois équations donne :

$$k_t = 4,2 \cdot 10^9 \quad k_{r1} = 1,4 \cdot 10^9 \quad y = \epsilon(\text{Car}^+, 910 \text{ nm}) = 135\,000$$

(nous avons estimé la précision à $\pm 30\%$).

On peut obtenir une estimation peu précise de k_{r2} à partir des courbes donnant $\Delta \text{DO}(910 \text{ nm})$ en fonction du pH (figure 47, 48, 49). Note schéma réactionnel suppose que, à tous les pH, la formation initiale de ${}^3\text{BH}^+$ est la même. On a alors :

- à pH acide ${}^3\text{BH}^+$ est totalement converti en ${}^3\text{BH}_2^{++}$; celui-ci disparaît spontanément (k_7) ou par réaction avec le carotène (k_{r2}). On a donc :

$$[\text{Car}^+]_{\text{acide}} = [\text{}^3\text{BH}_2^{++}]_{\text{max}} \times \frac{k_{r2} \times [\text{Car}]}{k_7 + k_{r2} \times [\text{Car}]}$$

- à pH neutre $\text{}^3\text{BH}^+$ réagit totalement avec le carotène ; on a donc :

$$[\text{Car}^+]_{\text{neutre}} = [\text{}^3\text{BH}^+]_{\text{max}} \times \frac{k_{r1}}{k_T}$$

Comme $[\text{}^3\text{BH}_2^{++}]_{\text{max}} = [\text{}^3\text{BH}^+]_{\text{max}}$, on peut écrire :

$$\frac{[\text{Car}^+]_{\text{acide}}}{[\text{Car}^+]_{\text{neutre}}} = \frac{(\Delta \text{DO}, 910 \text{ nm})_{\text{acide}}}{(\Delta \text{DO}, 910 \text{ nm})_{\text{neutre}}} = \frac{k_T}{k_{r1}} \times \frac{k_{r2} \times [\text{Car}]}{k_7 + k_{r2} \times [\text{Car}]}$$

Nous avons mesuré ce rapport de variations de DO pour différentes concentrations en carotène ou en zéaxanthine. Avec $k_T = 5,6 \cdot 10^9$, $k_{r1} = 1,4 \cdot 10^9$ et $k_7 = 2,7 \cdot 10^5$ nous avons obtenu :

$$\begin{aligned} k_{r2} &= 1,1 \cdot 10^{10} && (\text{carotène}) \\ k_{r2} &= 7 \cdot 10^9 && (\text{zéaxanthine}) \end{aligned}$$

Ces valeurs sont au mieux des ordres de grandeur. En fait on a certainement $k_{r2} < k_{\text{diffusion}} = 5,3 \cdot 10^9$. Il est possible que les chiffres soient trop élevés à cause d'une surestimation de k_7 . De toutes manières le calcul précédent est très sensible à la valeur de k_{r1} qui résulte elle aussi d'un calcul peu précis.

D.4.4 Discussion

Pour en revenir au point de départ de ce travail sur les photoréactions du carotène avec le bleu de toluidine, c'est à dire aux expériences de CHICHESTER et coll. sur la photooxydation non réversible du carotène sensibilisée par le BT et sur la protection des organismes par le carotène contre les effets photodynamiques du BT, nous pouvons dire :

- que le carotène est un "quencher" très efficace de l'état triplet du BT et qu'il peut ainsi contribuer à diminuer les effets photodynamiques par ce mécanisme de transfert puis de thermalisation de l'énergie.

- que la forme réversiblement oxydée du carotène peut être une étape dans son oxydation irréversible par l'oxygène moléculaire.

Toutefois certains problèmes restent en suspens au sujet de cette forme réversiblement oxydée Car^+ .

D.4.4.1 Mécanismes de disparition de Car^+

L'éclairement prolongé d'une solution de carotène et de BT ne laisse pas subsister d'augmentation de DO vers 910 nm, et en spectroscopie par éclairs on observe la réversibilité ; toutefois nous n'avons par la preuve que les réactions de retour redonnent le carotène : nos méthodes ne permettraient pas de déceler la formation d'un autre caroténoïde. On peut envisager les mécanismes suivants :

- Réaction avec les ions OH^- ; une réaction éventuelle serait favorisée par attraction électrostatique. On observe effectivement une accélération de la cinétique de retour en milieu basique. La possibilité de réaction avec les ions OH^- a été signalée par HOIJTINK, d'une

d'une manière beaucoup plus générale, pour les hydrocarbures ayant perdu un électron [78]. La réaction peut donner soit $\text{OH}^\bullet$ (qui donnera H_2O_2), soit $\text{Car OH}^\bullet$. On aurait alors :



et ensuite : $\text{Car OH}^+ \longrightarrow \text{Car O} + \text{H}^+$, on peut ainsi obtenir une xanthophylle.

- Réaction avec l'éthanol. On peut envisager de la même façon une réaction de Car^+ avec $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^-$, ce qui donnerait un éthoxy-carotène et certains dérivés de l'éthanol (en particulier l'aldéhyde).

Cette réaction, de même que la réaction avec OH^- , peut être comparée à une observation de ZECHMEISTER et coll [18] [138] [173]. Ces auteurs ont synthétisé de l'hydroxy- et de l'éthoxy-carotène par traitement à l'eau ou à l'éthanol du complexe formé par l'alpha-carotène avec le BF_3 (trifluorure de bore). Or Car^+ a des propriétés très voisines des complexes des caroténoïdes avec BF_3 (ce point sera développé au paragraphe E).

- Réaction inverse avec $\text{BH}^\bullet$ ou avec BH_2 . La réaction avec BH_2 est peut-être non négligeable. Cette réaction est susceptible de rendre compte de l'allure des courbes de photoréduction du BT en milieu acide, en présence de carotène (figure 41) : après quelques minutes d'éclairement la vitesse de photoréduction est fortement ralentie.

D.4.4.2 Transfert d'énergie et transfert de charge

Le schéma présenté pour rendre compte de nos observations est tout à fait cohérent avec les propriétés des colorants thiaziniques. Il y a un point qui est tout à fait original dans la réaction de $^3\text{BH}^+$ avec le carotène, c'est qu'il y ait possibilité de transfert d'énergie et de transfert de charge.

Nous n'avons pas eu connaissance d'autres cas où il y ait cette double possibilité pour une même paire de molécules. Nous ignorons si cette absence est le fait du hasard ou si elle repose sur des raisons théoriques.

D.4.4.3 Propriétés spectroscopiques du Car^+

Cet aspect sera détaillé au paragraphe E.

E - DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de cette étude nous avons tenté de démontrer expérimentalement l'existence de deux états métastables des caroténoïdes :

- l'état triplet, ^3Car .
- un état oxydé réversiblement, Car^+ .

Nous nous proposons maintenant de discuter quelques-unes des propriétés spectroscopiques de ces états ; dans une deuxième étape nous chercherons à préciser comment les propriétés de ^3Car et de Car^+ sont susceptibles d'expliquer certains rôles biologiques des caroténoïdes.

La discussion sera scindée en deux parties, correspondant respectivement à ^3Car et à Car^+ ; ces deux états posent en effet des problèmes assez différents.

E.1 Etat triplet des caroténoïdes

E.1.1 Rappel des propriétés

L'état triplet des caroténoïdes n'a pas pu être décelé par excitation directe, mais seulement par transfert d'énergie à partir de la chlorophylle A ou du bleu de toluidine à l'état triplet. Il est caractérisé par une bande d'absorption intense centrée vers 520 nm ; sa demi-vie, comprise entre 5 et 10 μ s, est peu influencée par la température, mais elle est notablement diminuée par une réaction bimoléculaire avec les gaz paramagnétiques.

E.1.2 Discussion des propriétés spectroscopiques

Deux aspects des propriétés spectroscopiques de l'état triplet des caroténoïdes ont retenu notre attention : le niveau d'énergie et les mécanismes de désexcitation.

E.1.2.1 Niveau d'énergie

Le niveau d'énergie de l'état triplet des caroténoïdes n'est pas encore connu exactement. Nous verrons que cette donnée est importante pour tenter d'expliquer les propriétés biologiques de ces pigments. Ce niveau d'énergie sera en fait exprimé par la longueur d'onde de la bande 0-0 de la transition $T_1 \leftarrow S_0$ (c'est pour des raisons qui apparaîtront plus loin que nous avons choisi la longueur d'onde : pour les polyènes ce paramètre varie linéairement avec le nombre de doubles liaisons conjuguées).

On peut obtenir des informations par différentes méthodes :

a) Arguments tirés de la luminescence et des propriétés de conduction.

Nous rappelons pour mémoire les valeurs obtenues par ces méthodes, qui ont donné des résultats très variables (cf. paragraphe A.2.2. et A.2.3) :

750 nm, par photoconductivité de cristaux de carotène (CHERRY et CHAPMAN [23])

400 nm, par des arguments tirés de la photoconductivité (ROSENBERG [150])

550 nm, par phosphorescence du lycopène (LEWIS et KASHA [107])

590 nm, par phosphorescence du carotène (CHERRY et coll [24])

Il nous semble très probable que toutes ces valeurs concernent en fait des impuretés.

b) Arguments tirés du transfert d'énergie.

De nombreux pigments, portés à l'état triplet, sont capables de transférer leur énergie aux caroténoïdes ; parmi les pigments essayés la chlorophylle A est celui qui a le niveau triplet le plus bas : environ 1 010 nm [137]. On peut supposer que le niveau d'énergie de ^3Car est situé nettement en-dessous de celui de $\text{Chl } A_T$ car les constantes de vitesse de transfert sont pratiquement celles de réactions contrôlées par la diffusion (paragraphe D.3.2.1 et C.2.2.).

Néanmoins un certain nombre d'expériences ont montré que le transfert d'énergie en solution pouvait être très rapide même si le niveau d'énergie de l'accepteur est supérieur à celui du donneur [73]. Une telle transition est appelée non-verticale car elle s'accompagne d'un changement de conformation de l'accepteur, ce qui aboutit à une isomérisation cis-trans. Le carotène est a priori susceptible de subir une telle transformation. En fait on peut écarter l'hypothèse suivant laquelle le transfert d'énergie $\text{Chl } A_T \longrightarrow ^3\text{Car}$ serait dû à cet effet car nous avons observé

un tel transfert en milieu liquide et nécessite une énergie d'activation solide, à 77°K, alors que la transition non-verticale se fait en milieu liquide et nécessite une énergie d'activation.

c) Arguments tirés de la réaction avec l'oxygène.

L'oxygène désactive des molécules excitées à l'état triplet [142], ce qui est souvent interprété comme un transfert d'énergie [90] :



L'oxygène est un accepteur universel du fait du faible niveau d'énergie de son état singulet ${}^1\Delta_g$: 1 260 nm. Des donneurs triplets de plus haute énergie peuvent produire l'état singulet ${}^1\Sigma_g$: 757 nm. En ce qui concerne le carotène il y a des arguments contradictoires.

En effet FOOTE et DENNY [54] ont montré que le carotène était capable d'empêcher l'oxydation d'un méthylpentène par l'oxygène singulet (certaîement ${}^1\Delta_g$) produit chimiquement ou photochimiquement, par excitation du bleu de méthylène, sous air. Le carotène n'étant pas oxydé à la suite de ces réactions, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il y avait transfert d'énergie :



Une telle réaction, permise pour des raisons de spin, suppose que le niveau d'énergie de ${}^3\text{Car}$ est inférieur à celui de ${}^1\text{O}_2$.

Cela semble être en contradiction avec le quenching de ${}^3\text{Car}$ par l'oxygène, comme nous l'avons observé (paragraphe C.1.3, C.3.2.3., D.3.2.1), dont la constante de vitesse varie entre 6,8 et $12 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dans différentes conditions. Toutefois il faut remarquer que NO peut aussi désexciter ${}^3\text{Car}$ (paragraphe C.1.3) alors qu'il ne possède pas de niveau d'énergie susceptible de donner lieu à un transfert [72]. On peut donc considérer que la désexcitation de ${}^3\text{Car}$ par O_2 et NO se fait par d'autres mécanismes que le transfert d'énergie.

Parmi ces mécanismes, qui ont été discutés récemment par plusieurs auteurs [10] [79] [90], le plus important semble être le mécanisme de désexcitation par échange, dans lequel la conversion non radiative, pour une molécule dans un état triplet excité, est accélérée par la formation d'un "complexe d'échange" avec une molécule paramagnétique. Le mécanisme est plus probable si la molécule initialement à l'état triplet peut facilement dissiper son énergie électronique en énergie vibrationnelle. C'est bien le cas pour le carotène, pour lequel on peut attendre que une collision sur 9 avec O_2 entraîne la désexcitation [79].

Il est donc possible d'interpréter nos résultats sans faire appel à un transfert d'énergie entre ${}^3\text{Car}$ et O_2 , et d'admettre que l'énergie de ${}^3\text{Car}$ est inférieure à celle de ${}^1\text{O}_2({}^1\Delta_g)$.

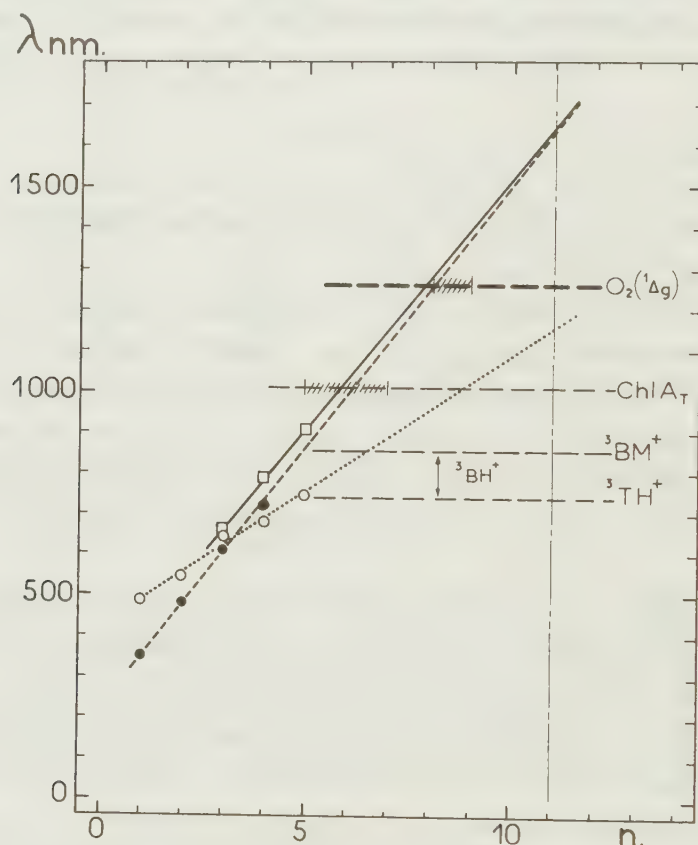
c) Arguments tirés de la comparaison avec d'autres polyènes.

Dans un travail théorique BAIRD [6] a calculé les énergies d'excitation $T_1 \longleftarrow S_0$ pour des polyènes de longueur croissante (figure 50) ; pour un nombre de doubles liaisons n compris entre 1 et 5, la longueur d'onde de la transition est une fonction linéaire de n. Le même paramètre a été mesuré par EVANS [46][47] en spectroscopie d'absorption, dans le chloroforme sous une forte pression d'oxygène ; les résultats, reportés sur la fig. 50, concernent des polyènes (n° 1 à 4) et des polyènes-aldéhydes (n° 3, 4, 5).

L'extrapolation linéaire des résultats de EVANS donne pour n = 11 (carotène) une longueur d'onde plus grande que celle de $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$, alors que la courbe théorique donne une longueur d'onde plus courte. On peut remarquer que la courbe théorique a une pente nettement plus faible que les courbes expérimentales ; elle ne peut donc constituer qu'une première approximation.

Il n'est pas évident qu'on ait le droit de faire une extrapolation linéaires jusque $n = 11$. Cependant nous allons discuter quelques arguments physico-chimiques en faveur d'une telle extrapolation. Ces arguments seront basés sur les propriétés d'analogues du carotène, à nombre plus faible de doubles liaisons conjuguées.

CIAES [26] a montré que la photoréduction de la chlorophylle A dans la pyridine, en présence d'acide ascorbique comme réducteur, était inhibée par le carotène et par le dzéta-carotène ($n = 7$), mais ne l'était pas par le phytofluène ($n = 5$). La photoréduction se faisant par l'intermédiaire de l'état triplet Chl A_T [112], on peut interpréter l'inhibition par un transfert d'énergie de Chl A_T au polyène. Le résultat de CIAES permet alors d'attendre que la courbe de la figure 50 coupe le niveau de Chl A_T entre $n = 5$ et $n = 7$.



- Figure 50 -

Longueur d'onde de la bande 0-0 de la transition $T_1 \leftarrow S_0$ pour des polyènes comportant un nombre variable de doubles liaisons conjuguées (n).

. polyènes (EVANS [46] [47]); extrapolation : - - - -

□ polyène-aldéhydes (EVANS [46]); extrapolation : ————

○ polyènes, prévisions théoriques (BAIRD [6]); extrapolation : ······

Nous avons aussi situé la longueur d'onde de la même transition pour la chlorophylle A (d'après PARKER et JOYCE [137]), pour $O_2(^1\Delta_g)$ (d'après WAYNE [179]) et pour des thiazines : $^3TH^+$ (d'après KRAMER [98] [99]), $^3BM^+$ (d'après KEARNS et coll [93]); l'état triplet du BT ($^3BH^+$) est probablement situé entre ces deux colorants (paragraphe D.2.3.1c).

Par ailleurs MATHEWS-ROTH et KRINSKY ont étudié la protection qu'exercent les caroténoïdes bactériens contre les photooxydations sensibilisées par le bleu de toluidine [121] [122]. Un pigment à 9 doubles liaisons conjuguées exerce un effet protecteur qui n'a pas lieu avec $n = 8$. Il apparaît clairement sur la figure 50 que la différence d'effet protecteur ne peut provenir d'un transfert d'énergie différent du BT aux deux polyènes ; elle provient probablement d'une différence dans le transfert d'énergie de l'oxygène singulet aux deux polyènes ; l'oxygène singulet étant produit par transfert depuis le BT à l'état triplet ($^3\text{BH}^+$). On peut donc s'attendre à ce que la courbe de la figure 50 coupe le niveau de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ entre $n = 8$ et $n = 9$.

FOOTE a également montré que $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ était désexcité par un bêta-apo-8'-caroténol ($n = 9$) et qu'il ne l'était pas par le rétinol ($n = 5$) [53]. Un autre fait expérimental vient corroborer ces résultats ; CLAES et NAKAYAMA [26] [27] ont montré que les caroténoïdes protégeaient la Chl A contre la photooxydation en solution, sous air. Le neurosporène ($n = 9$) exerce un effet protecteur, à la différence du dzéta-carotène ($n = 7$). Cette inégalité ne provient pas d'une inégalité dans le transfert d'énergie de Chl A_T au polyène puisque nous avons vu précédemment que le dzéta-carotène avait un niveau inférieur à celui de Chl A_T. On peut donc penser que la différence provient d'une position différente des niveaux triplet des deux caroténoïdes par rapport à $^1\text{O}_2$.

Il apparaît donc logique d'extrapoler linéairement les résultats de EVANS [36] [47] jusqu'au niveau du carotène. On pourrait situer vers 1 500 nm (soit $19,5 \text{ kcal.mole}^{-1}$) la transition $\text{Car} \longrightarrow ^3\text{Car}$ (bande 0-0).

E.1.2.2. Désexcitation des caroténoïdes

Les caroténoïdes, portés à leur premier état singulet excité, ne fluorescent pas et ne donnent pas lieu à des réactions photochimiques [167]. Nous apportons une information complémentaire : le rendement de passage à l'état triplet est très faible (paragraphe C.5.4). Le processus de conversion interne est donc très rapide. L'état triplet n'a pu être peuplé d'une façon mesurable que par transfert d'énergie triplet-triplet ; nous nous proposons de discuter les voies de désexcitation de cet état triplet.

Nous avons obtenu les valeurs suivantes pour la constante de vitesse de désexcitation k_d (dans différents milieux, à différentes températures) :

hexane	éthanol	chloroplastes	CS_2	micelles	micelles ou chloroplastes
21 °C	21 °C	21 °C	21 °C	21 °C	77 °K
$10^{-4} \times k_d (\text{s}^{-1})$	15_{+1}	14_{+1}	$11_{+0,2}$	9_{+1}	$7,8_{+0,4}$
					$6,6_{+0,4}$

Cette constante de vitesse résulte de plusieurs mécanismes, et nous l'écrirons :

$k_d = k_p + k_r + k(I) + k_v$, somme des constantes de vitesse de désexcitation radiative sous forme de phosphorescence (k_p), de réaction chimique (k_r), de désexcitation avec des impuretés à la concentration (I), et de conversion intersystème en énergie vibrationnelle (k_v). Nous allons examiner chacun des termes ci-dessus pour tenter de rendre compte de la valeur de k_d ($\sim 10^5 \text{ s}^{-1}$, ce qui est très élevé pour un état triplet), et de ses variations avec le solvant et la température.

a) Phosphorescence k_p

La constante de vitesse k_p peut être déduite du spectre d'absorption $T_1 \leftarrow S_0$; suivant PLATT on peut faire l'approximation suivante : [138] $k_p \sim 10^4 \epsilon_{\max}$. Nous avons trouvé (paragraphe C.5.4) une limite supérieure au coefficient d'extinction maximal de la transition précédente : $\epsilon_{\max} < 0,5$. On aurait donc $k_p < 0,5 \cdot 10^4 s^{-1}$.

Nous n'avons pas pu déceler de phosphorescence de la lutéine, dans des micelles de digitonine, à 77 °K (paragraphe C.5.4c). Toutefois ce résultat est sans signification si le niveau d'énergie que nous avons déduit pour ^3Car est correct, correspondant à une longueur d'onde de 1 500 nm, à laquelle l'appareil utilisé n'a aucune sensibilité.

b) Réactions chimiques k_r

Ce terme inclut des réactions chimiques, dont le rendement est négligeable ici, et les isomérisations.

Des expériences de CLAES et NAKAYAMA [26] [28] ont montré que l'éclairement sous vide de solutions contenant des caroténoïdes et de la chlorophylle A, n'entraînait d'isomérisation que dans le sens cis-trans, mais pas dans le sens inverse. Dans nos expériences partant de la forme entièrement trans, nous n'avons pas non plus observé d'évolution caractérisée du spectre d'absorption après éclaircissement dans les bandes de la chlorophylle A.

Ce résultat peut sembler surprenant car il est bien connu que les oléfines et les polyènes courts donnent lieu à des isomérisations trans $\rightarrow$ cis avec un rendement important, après passage à l'état triplet [171]. La raison de ces isomérisations est que l'état triplet est stabilisé par rotation de 90° autour d'une double liaison, le retour se faisant d'une façon quasiment équiprobable à la forme cis ou à la forme trans de l'état fondamental.

Au moyen de calculs théoriques, BAIRD a montré qu'une telle stabilisation n'existait pas pour les polyènes longs ($n > 4$), et qu'il y avait au contraire une barrière de potentiel pour une telle rotation ($\sim 10 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour l'hexatriène) [6]. On a sans doute la même chose pour le caroténoïdes. Cela n'exclut quand même pas toute possibilité d'isomérisation à partir de l'état triplet, dans la mesure où le transfert d'énergie laisse la molécule dans un état vibrationnellement excité. Toutefois il est raisonnable de négliger k_r devant k_d .

c) Réaction de désexcitation par des impuretés $k(I)$

Il s'agit ici d'impuretés qui désexcitent les états triplets, en particulier l'oxygène. Ces impuretés doivent désexciter tout aussi bien Chl A_T ; or les expériences que nous avons effectuées en solution comportaient d'abord des mesures de variation d'absorption avec la chlorophylle seule, dans la même cuve. La durée de vie de Chl A_T a toujours été supérieure à 150 μs , ce qui permet d'affirmer que $k(I) < 7 \cdot 10^3 s^{-1}$. Il est très improbable que les impuretés soient amenées par le caroténoïde, car nous avons obtenu des résultats identiques avec du carotène synthétique, du carotène fraîchement extrait et des xanthophylles préparées au laboratoire.

Nous ne pouvons pas exclure totalement l'intervention de la réaction $^3\text{Car} + \text{Car} \rightarrow 2 \text{Car}$ car nous n'avons pu faire de mesure de k_d que dans une gamme restreinte de concentrations en carotène (3 à $12 \cdot 10^{-5} M$).

d) Conversion intersystème (transition non radiative $T_1 \longrightarrow S_0$) k_v

Ce mécanisme correspond au passage de l'état triplet excité à un niveau vibrationnellement excité de l'état fondamental, qui est rapidement thermalisé par collision. La probabilité de transition non-radiative est d'autant plus grande que la différence d'énergie entre les deux états correspond à un plus petit nombre de quanta vibrationnels, et il a été montré, pour les hydrocarbures aromatiques, que k_v augmentait rapidement à mesure que diminuait le niveau d'énergie de l'état triplet [158].

Pour le carotène la différence d'énergie entre les deux états ($\sim 6700 \text{ cm}^{-1}$) correspond à environ 5 quanta vibrationnels ($\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$), et l'on peut s'attendre à une valeur élevée pour k_v . On a vu que les autres termes entrant dans k_d étaient négligeables ; on a donc $k_v \sim k_d$, et il faut que k_v puisse rendre compte des variations de k_d .

Ces variations sont faibles et ne semblent pas suivre une loi simple ; on peut constater un léger effet de température et un effet de type viscosité (différence entre hexane et micelles, par exemple). Un certain nombre d'expériences ont montré que la majeure partie des effets de température et de viscosité sur les durées de vie d'états triplets provenait de la désexcitation par des impuretés [113] [115] [119]. Toutefois certains effets ne peuvent recevoir cette explication [73]. Il semble qu'il en soit de même ici.

La faible valeur de k_d obtenue dans le CS_2 , à température ordinaire, nous semble difficile à expliquer. Peut-être est-il possible de la rapprocher de deux autres singularités observées dans le CS_2 : le coefficient d'extinction est très faible et la bande d'absorption plus large que dans les autres milieux (paragraphe C.2.3). Ces singularités mériteraient peut-être une étude plus approfondie.

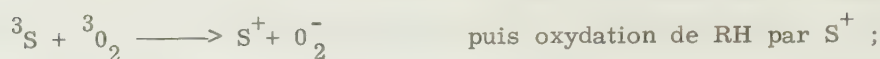
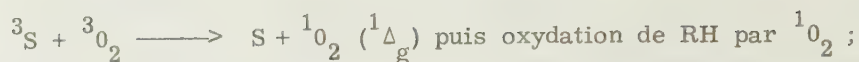
E.1.3 Conséquences biologiques

Les résultats que nous avons obtenus sur les chloroplastes ne permettent pas actuellement d'envisager que l'état triplet des caroténoïdes participe au mécanisme d'accumulation d'énergie, dans la photosynthèse. Nous allons discuter la possibilité que la formation de ³Car par transfert d'énergie soit une étape d'un phénomène plus général, qui est la protection des organismes contre les effets nocifs des rayonnements ou effets photodynamiques.

E.1.3.1 Les effets photodynamiques

Le terme d'effets photodynamiques est employé pour désigner des réactions sensibilisées par certains pigments, et qui se font avec consommation d'oxygène (photoautooxydations), chez les êtres vivants. Les pigments sensibilisateurs sont des pigments naturels (riboflavine, pigments porphyriniques) ou bien des pigments incorporés ; on utilise souvent les colorants thiaziniques, bleu de méthylène et bleu de toluidine. Pour une revue détaillée de ces effets on peut se reporter à SPIKES [160].

Les mécanismes primaires de ces photooxydations sensibilisées sont encore controversés (un certain nombre de discussions ont été publiées récemment sur ce sujet, par SCHNURIGER et BOURDON [155], FOOTE [52], GROSSWEINER [67], KEARNS et KAHN [92]). Les mécanismes qui semblent les plus importants sont l'oxydation par l'oxygène singulet, et l'oxydation consécutive à un transfert de charge entre le sensibilisateur S à l'état triplet et l'oxygène ou le substrat oxydable RH :



Il est probable que les mécanismes sont fonction de la nature du sensibilisateur et du substrat. Nous allons discuter brièvement les effets de protection du carotène dans ces mécanismes, dans les structure biologiques.

E.1.3.2 Protection exercée par le carotène, par désexcitation de 1O_2

L'oxygène singulet, formé par transfert d'énergie à partir du sensibilisateur, peut diffuser dans la cellule et oxyder une molécule biologique importante : enzyme, acide nucléique Un grand nombre de résultats expérimentaux indiquent que le carotène, contenu naturellement par l'organisme, inhibe les effets photodynamiques dus à un colorant incorporé [103]. Les expériences consistent généralement en la comparaison de la photodestruction sur des souches sauvages et sur des mutants contenant des caroténoïdes anormaux.

Il y a de nombreuses expériences qui démontrent que des caroténoïdes comportant moins de 9 doubles liaisons conjuguées n'ont pas d'effet protecteur [103]. L'utilisation de mutants laisse généralement subsister une ambiguïté car on n'est jamais sûr que la mutation n'a qu'un seul effet ; en particulier les mutants caroténoïdiens ont souvent une structure défectueuse. La différence générale entre caroténoïdes à 7 et à 9 doubles liaisons fait penser qu'il ne s'agit pas d'une différence de structure du mutant. La coupure entre $n = 7$ et $n = 9$ s'observe avec le bleu de toluidine comme sensibilisateur ; il ressort clairement de la figure 50 que cette différence ne peut être due à une différence de niveau triplet par rapport à $^3BH^+$. Il est donc probable que les caroténoïdes avec $n \geq 9$ inhibent les effets photodynamiques en désactivant 1O_2 .

Il faut d'ailleurs remarquer que le carotène in vivo ne peut probablement pas diffuser librement et que les pigments hydrosolubles incorporés ont ainsi une probabilité beaucoup plus grande de transférer leur énergie à l'oxygène qu'au carotène. Le fait que le carotène exerce un effet protecteur constitue donc un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse suivant laquelle l'agent oxydant serait 1O_2 .

E.1.3.3. Protection exercée par le carotène par transfert d'énergie $^3S \rightarrow ^3Car$

Pratiquement cette protection ne peut s'exercer que si le sensibilisateur et le carotène sont très rapprochés, au sein d'une même structure. C'est typiquement le cas dans les structures photosynthétiques où le transfert $Chl A_T \rightarrow ^3Car$ est très rapide ($k_T \sim 3.10^7 s^{-1}$) (paragraphe C.5.3). Ce transfert rapide est particulièrement nécessaire pour protéger des photooxydations les organismes photosynthétiques : les chloroplastes étant le siège du dégagement d'oxygène la concentration de ce dernier y est particulièrement élevée. De plus la chlorophylle A est un sensibilisateur particulièrement efficace, par l'intermédiaire de son état triplet [101], [156]. Le rendement de fluorescence de la chlorophylle in situ est d'environ 3 % [148] ; et il y a peu de raisons pour que le rapport de l'émission de fluorescence et de la formation de $Chl A_T$ soit différent in vivo et en solution, où ce rapport est compris

entre 0,5 et 1 [13] [137]. On peut donc évaluer à au moins 3 % le rendement de formation de Chl A_T in vivo.

En l'absence de mécanisme de protection on peut estimer que toute la chlorophylle d'un végétal serait détruite en quelques heures d'exposition au soleil... C'est effectivement ce qui se passe avec les mutants caroténoïdiens de maïs [145 bis], de chlorelles [86], ou de bactéries photosynthétiques [66]. Des observations similaires ont été faites sur des chromatophores de bactéries : mutants caroténoïdiens [15] ou organismes dont la synthèse de caroténoïdes a été bloquée par la diphénylamine [59].

L'état triplet des caroténoïdes a une courte durée de vie ; le retour à l'état fondamental va se faire en partie spontanément, en partie par réaction avec l'oxygène. Cette réaction ne peut produire 1O_2 pour des raisons énergétiques, et elle aboutit rarement à l'oxydation du carotène [54]. Le mécanisme de dégradation de l'énergie en excès est donc presque parfait.

Il y a quand même toujours une certaine probabilité d'époxydation du caroténoïde par l'oxygène singulet ; et il est possible que c'est par ce mécanisme que se font les époxydations, dans la série d'équilibres entre xanthophylles plus ou moins oxydées, dans la feuille (paragraphe A.3.3c, figure 4). S'il en était ainsi le mécanisme de protection des plantes supérieures contre les photooxydations serait parfaitement adapté puisqu'il comprendrait le mécanisme de réparation du système de protection.

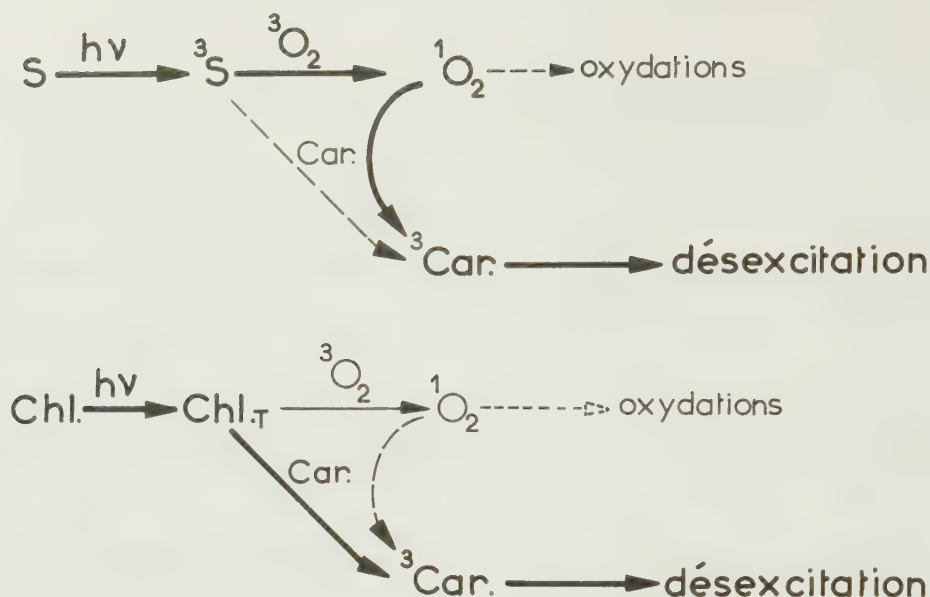
Dans l'hypothèse de l'existence de deux systèmes photochimiques chez les végétaux supérieurs, il est possible de pousser plus loin la spéculation.

En effet il y a des arguments pour situer essentiellement le carotène dans le système photochimique 1 et les xanthophylles dans le système 2 [164]. Or l'hypothèse a été faite suivant laquelle la chlorophylle du système 1 est très faiblement fluorescente [11] [43] ; la formation de ChlA_T doit donc y être très faible, et on peut s'attendre à ce que le carotène soit très peu transformé en époxyde. Il devrait en être différemment pour les xanthophylles, situées dans le système 2, dans lequel la chlorophylle est fluorescente. Ces spéculations sont en accord avec deux faits expérimentaux ;

- le cycle d'époxydations et de désépoxydations ne concerne pas le carotène [68] [187].

- les traitements de chloroplastes à l'heptane, qui enlèvent essentiellement le carotène, ont peu d'influence sur la formation de ^3Car (paragraphe C.5.1). De toute manière ceci ne peut être qu'une première approximation car les relations entre caroténoïdes sont très complexes dans la feuille [32].

E.3.1.4. La figure ci-après schématise les deux mécanismes par lesquels les caroténoïdes protègent les organismes contre les oxydations photosensibilisées. S est un sensibilisateur, naturel ou incorporé, ne faisant pas partie d'une même structure que les caroténoïdes, à la différence de la chlorophylle.



- Figure 51 -

Représentation schématique des effets protecteurs exercés par les caroténoïdes naturels.

E.2 Cation radical Car^+

E.2.1. Rappel des propriétés

L'état transitoire que nous avons interprété comme étant l'ion-radical Car^+ a les propriétés suivantes :

- Formation par transfert d'un électron d'une molécule de carotène à une molécule de bleu de toluidine portée à l'état triplet ($^3BH^+$ ou $^3BH_2^{++}$) ce qui donne une molécule de BT dans une forme semi-réduite, et une molécule Car^+ . La réaction de transfert d'électron est en compétition avec une réaction de transfert d'énergie triplet-triplet de $^3BH^+$ au carotène ; on obtient environ 3 molécules 3Car pour une molécule Car^+ .

- Car^+ a une bande d'absorption intense ($\epsilon \sim 135\,000$), centrée à 910 nm. On observe corrélativement une diminution d'absorption dans la bande du carotène.

- La demi-vie de Car^+ est d'environ 200 μs dans l'éthanol neutre ; dans le même solvant elle augmente en milieu acide et diminue en milieu basique. Car^+ redonne une molécule de carotène, en première approximation.

E.2.2. Propriétés spectroscopiques

L'étude des variations transitoires de DO, après une excitation lumineuse, donne des résultats qui sont en accord avec l'hypothèse de la formation de Car^+ . Nous allons discuter maintenant si la perte d'un électron par le carotène est susceptible d'entraîner l'apparition d'une bande d'absorption à 910 nm.

E.2.2.1 Interprétations

On peut donner deux interprétations, suivant l'ampleur des modifications de structure qu'entraîne la perte d'un électron pour la molécule de carotène.

a) Suppression de l'alternance

Dans le carotène, comme dans tous les polyènes linéaires pairs, à l'état fondamental, il y a alternance de simples et de doubles liaisons car on ne peut écrire qu'une seule structure de résonance principale. La figure 52 montre que, pour le carotène ayant perdu un électron, il est possible d'écrire deux structures correspondant à des positions décalées des doubles liaisons. Cela tend à rapprocher Car^+ d'un ion polyméthinique ; en effet, chez les ions polyméthiniques symétriques, il est possible d'écrire deux structures de résonance principales, isoénergétiques, correspondant à des positions décalées des doubles liaisons ; la conséquence est que, dans ces molécules, toutes les liaisons sont équivalentes (cf. paragraphe A.2.1).

Une théorie développée par KUHN [104], en extension de la théorie de l'électron libre, permet de prévoir la position de la bande d'absorption des polyméthines et des polyènes. Pour ces derniers, l'alternance de simples et de doubles liaisons entraîne un déplacement de la bande d'absorption vers les courtes longueurs d'onde par rapport à l'ion polyméthinique de même longueur. Les valeurs calculées par KUHN [104] pour les polyènes sont en bon accord avec l'expérience. Pour les polyméthines symétriques, KUHN obtient la valeur suivante pour la longueur d'onde du maximum de la première bande d'absorption :

$$\lambda_{\text{max}} = \frac{8 m c}{h} \times \frac{L^2}{N+1}$$

avec m = masse de l'électron = $9,1 \cdot 10^{-28} \text{ g}$; c = $3 \cdot 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$; h = $6,63 \cdot 10^{-27} \text{ erg.s}$;
 N = nombre d'électrons pi ; L = longueur de la chaîne conjuguée (cm).

Si on applique la formule pour Car^+ , en prenant $N = 21$ et $L = 21 \times 1,39 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$ (approximativement), on trouve :

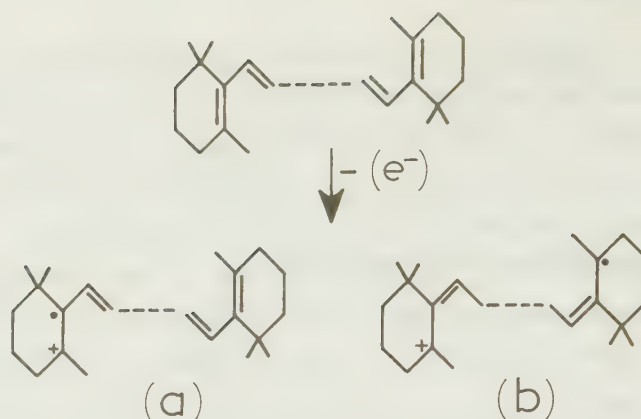
$$\lambda_{\text{max}} = 1280 \text{ nm}$$

une formule donnée par PLATT [140] donne un résultat peu différent :

$$\lambda_{\text{max}} = 1050 \text{ nm}$$

Les valeurs ci-dessus sont obtenues en supposant que les deux structures résonantes sont isoénergétiques : une dissymétrie entraîne une diminution de la longueur d'onde de la transition. Dans le cas de Car^+ il y a dissymétrie formelle entre les structures (a) et (b) de la figure 52. Il ne serait donc pas surprenant que la longueur d'onde observée (910 nm) soit inférieure à celle qu'on obtiendrait avec deux structures symétriques.

Une telle interprétation très qualitative, suivant le schéma de valence, ne donne pas une représentation correcte de la répartition des charges dans Car^+ , que l'on pourrait obtenir par la méthode des orbitales moléculaires. De plus on peut penser que le fait d'enlever un électron pi, sur 22, ne peut pas avoir un effet important sur les distances interatomiques dans la molécule.



- Figure 52 -

Structure du carotène et structures possibles de Car^+ . Pour ce dernier on peut aussi écrire des structures symétriques de (a) et de (b).

b) Maintien de l'alternance

On peut considérer que l'ion conserve la même géométrie que la molécule neutre, et que les énergies des différentes orbitales de Car et de Car^+ sont pratiquement identiques (figure 53).

Sur le diagramme des énergies, ces orbitales sont réparties à peu près en deux groupes symétriques (orbitales liantes et antiliantes), suivant une propriété des hydrocarbures alternants [83]. La différence d'énergie entre la plus haute orbitale pleine et l'orbitale vide la plus basse, dans le carotène, est assez importante, à cause d'une alternance prononcée entre liaisons simples ou doubles [152] [166]. La transition de plus grande longueur d'onde, dans Car, correspond au passage d'un électron du niveau (n) au niveau (n+1) ($\lambda_{\text{max}} \sim 450 \text{ nm}$). Pour le cation la transition précédente subsiste, mais il apparaît une bande de grande longueur d'onde, correspondant au passage d'un électron du niveau (n-1) au niveau (n).

Nous avons trouvé un coefficient d'extinction de 135 000, à 910 nm, pour Car^+ . Le spectre de différence (figure 44) permet d'estimer à environ 60 000 la variation de coefficient d'extinction (entre Car et Car^+) vers 450 nm, soit approximativement : $\epsilon(\text{Car}^+) \sim 1/2 \epsilon(\text{Car})$ à 450 nm. Le fait qu'une absorption importante subsiste dans Car^+ , à cette longueur d'onde, est tout à fait en accord avec l'interprétation précédente.

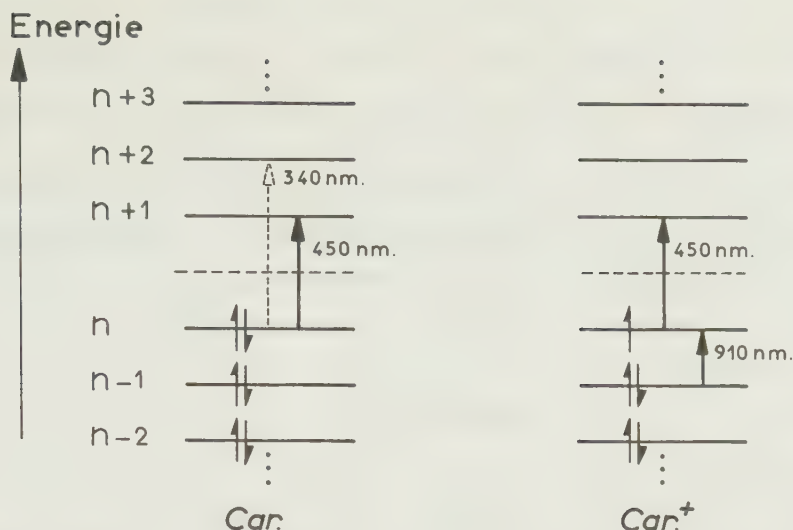
Il faut remarquer qu'une disposition symétrique de niveaux identiques pour Car et Car^+ donnerait, pour la transition (n) $\leftarrow$ (n-1) de Car^+ , la même énergie que la différence entre les transitions (n+2) $\leftarrow$ (n) et (n+1) $\leftarrow$ (n) de Car, c'est à dire que la longueur d'onde serait de 1 350 nm au lieu de 910 nm.

La comparaison avec les ions d'autres hydrocarbures alternants (paragraphe E.2.2.3) permettra de préciser cette interprétation.

E.2.2.2. Comparaison avec d'autres propriétés des polyènes

a) Protonation

BALL et MORTON [7] ont montré qu'en milieu acide la bande d'absorption de la vitamine A était déplacée de 330 nm jusque vers 600 nm. Un travail très étendu a ensuite



- Figure 53 -

Niveaux d'énergie des orbitales de Car et Car⁺ (n = 11). Cette interprétation nous a été suggérée par M. L. SALEM.

été fait sur ce sujet par WASSERMAN [175] [176] [177] [178]. Cet auteur a obtenu la protonation de caroténoïdes (carotène, lycopène) et de nombreux autres polyènes ; cette protonation est obtenue en milieu très acide (2M en acide fort) dans des solvants non basiques (benzène, chloroforme). Le polyène protoné est instable et le spectre d'absorption de la solution évolue au cours du temps. L'extrapolation au temps zéro permet d'obtenir le spectre d'absorption du polyène protoné ; celui-ci est caractérisé par une disparition de la bande d'absorption de grande longueur d'onde (cf. tableau p.102).

Les expériences de WASSERMAN ont été effectuées sous air ; l'interprétation qu'il propose (protonation du polyène) peut être critiquée car les travaux de AALBERSBERG et coll. (cf paragraphe E.2.2.3) ont montré qu'en présence d'oxygène on obtenait généralement l'ion monopositif, tout au moins avec les hydrocarbures aromatiques.

b) Complexe carotène-iode

Ce complexe a déjà été évoqué au paragraphe A.2.1. Ce complexe, instable également, a une bande d'absorption intense à 1000 nm.

c) Acides de Lewis

Les polyènes donnent des réactions colorées avec les acides de Lewis (BF₃, SbCl₃). Les vitamines A donnent un pic vers 620 nm avec le SbCl₃ suivant une réaction classique (réaction de Carr et Price), dans le chloroforme (cf tableau). Les mêmes réactifs produisent aussi une couleur bleue avec le carotène, mais il a été montré que le pic d'absorption principal était situé vers 1000 nm [31].

La vitamine A, absorbée sur la montmorillonite (argile comportant des sites accepteurs d'électrons) donne aussi le complexe bleu, dans des solvants apolaires [128].

d) Les propriétés spectroscopiques des dérivés polyéniques obtenus dans les réactions précédentes ont été expliquées par les auteurs en terme de résonance entre structures, ce qui confère au polyène une structure analogue à celles des ions polyméthiniques. En particulier il a été vérifié, dans le cas des réactions avec H^+ et $SbCl_3$, que la longueur d'onde du maximum d'absorption est une fonction linéaire du nombre de doubles liaisons (entre $n = 4$ et $n = 11$) ; Le tableau résume quelques-uns des résultats précédents ; les différents dérivés du carotène qui y sont mentionnés ont des propriétés d'absorption très semblables à celles de Car^+ ($\lambda_{max} = 910 \text{ nm}$; $\epsilon_{max} = 135 \text{ 000}$).

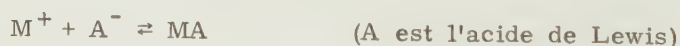
TABLEAU

Polyène		Réactif	Solvant	$\lambda_{max}(\text{nm})$	ϵ_{max}	Auteurs
$n=5$	Vitamine A	acides concentrés	chloroforme	660	non donné	BALL et MORTON [7]
	Vitamine A	$SbCl_3$	chloroforme	617	180 000	MORTON, cité par GOODWIN [63]
$n=11$	Carotène	iode	hexane, chloroforme	1000	200 000	LUPINSKI [117]
	Carotène	$SbCl_3$	hexane, chloroforme	1020	115 000	COLLINS [31]
	Carotène	acides concentrés	hexane, chloroforme, benzène	800	120 000	WASSERMAN [175]
				à 1000	à 150 000	
	Lycopène	acide trichloracétique, 2M	benzène	900	100 000	WASSERMAN [178]

E.2.2.3 Comparaison avec les monocations des hydrocarbures alternants

a) Résultats publiés

Les hydrocarbures aromatiques (M) donnent naissance à un ion monopositif M^+ quand ils sont en présence d'un acide de Lewis fort ($SbCl_5, BF_3$), dans un solvant non basique [2]. En fait il y a compétition entre un transfert d'électron et la formation d'un complexe covalent :



L'équilibre est gouverné par la constante de basicité et par le potentiel d'oxydo-réduction de M.

On a de même formation de M^+ dans l'acide sulfurique concentré [81] [180]. Dans les acides forts moins oxydants (HF , acide trifluoroacétique) il y a formation d'un complexe protoné MH^+ (ion carbonium) ; toutefois en présence d'air, dans les mêmes acides, on obtient essentiellement le cation radical M^+ . En fait il y a ici encore compétition entre la protonation et le transfert d'électron [1] [33] [62].

Il est remarquable que les spectres d'absorption de MA et de MH^+ soient identiques; cela signifie probablement que l'addition d'un proton (donnant naissance à un nouveau groupe méthylène) et l'addition de l'acide de Lewis se font sur le même atome de carbone. Il est remarquable aussi que les spectres d'absorption et de RPE de M^+ soient identiques à ceux de M^- , monoanion obtenu par action du sodium sur M, dans le tétrahydrofurane. Cette identité est prévue par une théorie développée par HOIJTINK pour les hydrocarbures alternants [76] [77]. Les hydrocarbures alternants sur lesquels ont été effectuées les expériences précédentes appartiennent à la série des hydrocarbures aromatiques polycycliques (anthracène, tétracène, pérylène) et aux éthylènes substitués (surtout 1,1-diphényléthylène).

Il ne semble pas que ces ions aient été décrits expérimentalement ni abordés au plan théorique en ce qui concernent les polyènes linéaires (au-delà du butadiène). Toutefois la théorie développée par HOIJTINK s'applique apparemment à tous les hydrocarbures alternants, et donc aussi aux polyènes. En ce qui concerne les diphénylpolyènes, leurs formes M^- ont été obtenues jusqu'au diphényldodécahexaène [80]. Comme pour les aromatiques, ces formes M^- ont une bande d'absorption de grande longueur d'onde; la longueur d'onde du maximum croît avec le nombre de doubles liaisons ($\lambda_{\max} = 780$ nm pour le diphényldodécahexaène)

b) Extrapolation au carotène

Les propriétés spectroscopiques des diphénylpolyènes et des polyènes linéaires sont très semblables (JAFFE et ORCHIN [83] p. 229). Dans la théorie développée par KUHN [104] on obtient pratiquement les mêmes propriétés d'absorption pour le polyène linéaire à n doubles liaisons conjuguées et pour un diphénylpolyène à (n-3) doubles liaisons centrales. L'analogue du carotène comporte 8 doubles liaisons centrales. Sur la base de la théorie de HOIJTINK on peut obtenir la bande d'absorption de ce polyène sous forme M^+ en extrapolant à huit doubles liaisons centrales les résultats obtenus pour la forme M^- d'une série de diphénylpolyènes (figure 3 dans HOIJTINK et VAN DER MEIJ [80]).

On obtient : $\lambda_{\max} = 850$ nm

Cette valeur doit être comparée à la valeur que nous obtenons pour Car^+ : 910 nm.

Par comparaison avec les résultats obtenus avec les hydrocarbures aromatiques, il est tentant de considérer que le maximum d'absorption vers 900 nm, obtenu avec le carotène dans différentes conditions, est dû à Car^+ . On obtient ces propriétés d'absorption par action des acides de Lewis, des acides forts en présence d'oxygène, de l'iode, ou par transfert d'un électron au bleu de toluidine à l'état triplet. Toutefois la même analogie avec les hydrocarbures aromatiques laisse supposer qu'il y a aussi formation de complexes covalents avec les protons et avec les acides de Lewis.

E.2.2.4 En définitive on peut dire que les arguments basés sur les théories ou sur les comparaisons spectroscopiques sont compatibles avec l'hypothèse que nous avons formulée à la suite de nos résultats en spectroscopie par éclairs : le carotène cède un électron au bleu de toluidine porté à l'état triplet. Ces résultats permettent d'écarter, au moins en première approximation, une autre hypothèse théoriquement possible : la protonation du carotène.

E.2.3 Conséquences biologiques

L'hypothèse a souvent été émise que les caroténoïdes ou les vitamines A jouaient un rôle dans les transferts d'électrons, en biologie [39] [143]. Le principal support physico-chimique de cette hypothèse réside dans les propriétés de semi-conductivité et de photoconductivité des caroténoïdes [22]. Sur le plan biologique les expériences concluantes sont pratiquement inexistantes. Il est possible que la forme Car^+ soit impliquée dans un transfert d'électron par un caroténoïde. Nous allons examiner si cette hypothèse peut rendre compte de quelques résultats en photosynthèse.

E.2.3.1 Equilibre redox des xanthophylles

L'étude des équilibres entre xanthophylles plus ou moins oxydées (cf. paragraphe A.3.3c, figure 4) a permis de distinguer des étapes de réduction et des étapes d'oxydation [32] [68] [187]. La réduction des xanthophylles est un processus enzymatique où Car^+ ne peut être impliqué ; par contre il peut constituer une étape dans le mécanisme d'oxydation.

E.2.3.2 Transfert d'électrons du carotène à la ferrédoxine

LUNDEGARDH a étudié l'action de la lumière sur des systèmes artificiels composés de gouttes de chloroforme contenant du carotène, en émulsion dans une solution aqueuse de NADP et de ferrédoxine [116]. Il a interprété ses résultats, et d'autres résultats obtenus *in vivo*, en termes de transfert d'électrons du carotène au NADP, par l'intermédiaire de la ferrédoxine.

Quoique l'existence d'une forme Car^+ soit de nature à étayer les hypothèses de LUNDEGARDH, les détails expérimentaux donnés par ce dernier ne permettent pas de considérer comme établi que le carotène puisse transférer un électron à un accepteur de la chaîne photosynthétique.

E.2.3.3 Oxydation irréversible de caroténoïdes

Des expériences de YAMASHITA et coll. [188] ont clairement démontré que la photooxydation non réversible des caroténoïdes du chloroplaste était étroitement liée au fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons. Alors que l'éclairement dans un tampon phosphate n'entraîne qu'une oxydation négligeable, l'addition de certains inhibiteurs de la réaction de Hill (hydroxylamine, carbonylcyanure de m-chlorophénylhydrazone CCCP) permet d'observer une augmentation de la vitesse de photooxydation ; d'autres inhibiteurs du transfert d'électrons (o-phénanthroline, DCMU) ont un effet antagoniste, de même que certains réducteurs comme l'ascorbate. La photooxydation des xanthophylles se fait beaucoup plus rapidement sous air que sous azote, mais la vitesse est la même pour le carotène.

Il est possible que la première étape de la photooxydation soit un transfert d'électron du carotène à un transporteur sous forme oxydée. Nous ne savons pas si la chlorophylle, excitée à l'état triplet, est capable d'oxyder le carotène ; les essais que nous avons effectués en solution n'ont pas permis de déceler Car^+ après excitation de la chlorophylle A. Toutefois *in vivo*, en certains sites particuliers, les propriétés d'oxydo-réduction de la chlorophylle peuvent être fortement modifiées. Une autre possibilité serait l'oxydation du carotène par certains composés très oxydants qui donnent naissance au dégagement d'oxygène.

Des expériences de JOLIOT et coll. [84] sont en faveur de l'existence de tels composés, encore inconnus du point de vue chimique.

Toutes les expériences sont très fragmentaires ; il en est de même des quelques expériences d'influence directe du carotène sur l'activité des chloroplastes [60] [85]. Il serait donc tout à fait prématuré d'affirmer que l'ion radical Car^+ est impliqué d'une façon ou d'une autre dans la photosynthèse. Il serait peut-être intéressant d'essayer de le détecter dans des chloroplastes par des expériences de spectroscopie d'éclairs. De même pourrait-il être intéressant de rechercher si la vitamine A possède une forme analogue ; en effet il y a un ensemble d'arguments beaucoup plus important [39] pour dire que la vitamine A est impliquée dans les transferts d'électrons au sein des membranes animales.

E.3 Conclusion

Les discussions précédentes laissent apparaître toutes les lacunes et les incertitudes qui subsistent, tant sur les propriétés physico-chimiques que sur le rôle biologique des états métastables des caroténoïdes. Il y a seulement quelques années, rien n'était connu sur ces états transitoires, hormis sur les isomères cis. Ces derniers ont une place fondamentale dans le rôle biologique des polyènes de la vision, mais rien ne permet actuellement de penser qu'il en est de même au sujet des caroténoïdes.

En ce qui concerne l'état triplet de ces pigments, il continuera encore longtemps à poser des problèmes, dans la mesure où l'on ne peut l'obtenir que par transfert d'énergie. Nous pensons avoir apporté une contribution à l'étude de ses propriétés physico-chimiques, en rapport avec un rôle biologique important : celui de protéger les organismes contre les effets photodynamiques. Ce rôle est particulièrement fondamental au sein des structures photosynthétiques ; dans ces structures nous avons mis en évidence un transfert d'énergie triplet-triplet très rapide de la chlorophylle aux caroténoïdes. Ce transfert peut être important à considérer dans toute discussion sur le rôle de l'état triplet de la chlorophylle, dans la photosynthèse.

Le niveau de nos connaissances est malheureusement encore plus faible en ce qui concerne le radical cation Car^+ , pour lequel notre travail constitue surtout l'ouverture d'une piste. En effet cet ion était encore inconnu ; le fait qu'on l'obtienne par une réaction photo-chimique permet de penser qu'il joue un rôle dans certains processus photobiologiques.

Existe-t-il d'autres états transitoires des caroténoïdes, mieux en rapport avec leurs propriétés biologiques supposées ou encore insoupçonnées ? Le fait que les deux états précédents soient de découverte très récente laisse supposer que le sujet peut avoir encore de nombreux développements.

ANNEXE 1

MONTAGE DES PHOTOMULTIPLICATEURS. OBSERVATION DES SIGNAUX

1 - Choix du tube photomultiplicateur

L'exigence principale était celle d'une large bande passante F associée à un rapport signal-bruit (S/B) important. Ces deux paramètres sont liés :

$$\frac{S}{B} = \left(\frac{I_{ph}}{2 e F} \right)^{1/2} = \left(\frac{P r}{2 h F} \right)^{1/2}$$

I_{ph} = courant de photocathode
 P = puissance lumineuse reçue par le PM
 r = rendement quantique de la photocathode

Ces formules montrent que l'exigence principale est d'augmenter I_{ph} ; c'est la raison pour laquelle nous avons choisi le PM en fonction de sa capacité de mesurer linéairement de fortes intensités lumineuses. Notre choix s'est porté sur le XP 1141 (Radiotechnique). Les caractéristiques principales de ce tube sont les suivantes :

- un gain faible pour une forte tension appliquée (par exemple 10^5 à 6000 V). Le faible gain évite un débit trop grand des derniers étages et la forte tension appliquée évite la saturation par charge d'espace.

- une réponse linéaire jusqu'à des courants d'anode supérieurs à 1 A en impulsion et des courants de photocathode de quelques dizaines de μA . La photocathode est striée de rayons conducteurs pour éviter la chute de sa tension de polarisation lors de l'émission d'un courant important.

- une bonne rapidité : temps de réponse de 2 ns.

Par ailleurs nous avons fait remplacer la photocathode normale de type S 11 par une cathode de type S 20. Celle-ci a un rendement quantique nettement meilleur et qui chute beaucoup moins vite dans la partie rouge du spectre (amélioration du facteur r de la formule ci-dessus). Le facteur P de la formule a été augmenté, particulièrement pour l'étude des phénomènes rapides, par l'utilisation d'un tube éclair comme source de lumière d'analyse.

Pour pouvoir effectuer des mesures jusque 1000 nm, nous avons utilisé un PM type 56 CVP (Radiotechnique), à cathode S 11. Les caractéristiques de linéarité sont moins bonnes qu'avec le XP 1141.

2 - Réalisation

a) XP 1141

Le montage représenté sur la figure 54 a été calculé pour $I_{ph} = 10 \mu A$, et pour des crêneaux de lumière de $3 \cdot 10^{-3}$ s (un par seconde), ce qui est mécaniquement facile à réaliser. Une bonne linéarité de l'optique d'entrée nécessite des tensions élevées, ce qui entraîne un gain total important et un risque de saturation des derniers étages. Pour lever cette contradiction nous avons sorti le signal sur une dynode D5, D6, ou D7 suivant les tubes. Cette solution ne présente pas d'inconvénients s'il y a au moins un étage alimenté

derrière la dynode de sortie. Nous avons travaillé avec un gain compris entre 1 et $5 \cdot 10^3$.

La mesure de forts courants nécessite un courant de pont important pour respecter les conditions $I_p \geq 10^2 \times \overline{I_{\text{anode}}}$. Les valeurs importantes du courant de pont, des tensions et des capacités ont nécessité un montage assez volumineux, avec deux boîtes séparées, pour les résistances et pour les condensateurs.

Le montage a été contrôlé de plusieurs façons :

. Linéarité de la réponse au créneau de 10^{-3} s. On mesure le créneau, à une longueur d'onde, en interposant des filtres gris calibrés. La linéarité est toujours meilleure que 5 % pour un courant de sortie de 5 mA. On observe des créneaux corrects jusqu'à plusieurs dizaines de mA.

. Linéarité de réponse à un éclair de 50 μ s. On peut alors sortir linéairement 100 mA. Nous avons aussi vérifié la linéarité de réponse à un éclair superposé à un créneau.

. Réponse en temps à une impulsion laser isolée ou superposée à un créneau de 10^{-3} s. Nous n'avons pas observé de différence.

Toutes les mesures ont été effectuées à des niveaux où la réponse du PM était linéaire à mieux que 5 %.

b) 56 CVP

Le montage est représenté sur la figure 55. Pour avoir une linéarité meilleure que 5 %, nous avons limité le courant de sortie à 1 mA (créneau de 10^{-3} s). Ce PM a été utilisé uniquement pour les expériences décrites au chapitre D. Sur ce PM nous n'avons vérifié que la linéarité de réponse au créneau.

3 - Observation des signaux

A la sortie du PM le problème est de mesurer une petite variation d'intensité (de 10 à 0,1 %) de courte durée, superposée à un signal plus important et plus long. Avec l'oscilloscope Tektronix 585 nous avons mesuré la tension créée à travers une résistance de charge dont la valeur (entre 100 et 20000 ohms) a été choisie aussi grande que possible, sans altérer les cinétiques mesurées. Nous avons utilisé trois techniques :

- Amplification différentielle. On fait la différence des signaux sortis par deux PM, l'un (PM de mesure) recevant de la lumière ayant traversé la cuve, l'autre (PM de référence) de la lumière prélevée à la sortie du chopper. En ajustant la hauteur des créneaux des deux PM, la différence, effectuée par un tiroir d'entrée différentiel (type Z) donne le signal recherché. La majeure partie du travail effectué sur les chloroplastes l'a été par cette technique, que nous avons abandonnée par la suite pour des raisons de commodité.

- Décalage du niveau de l'oscilloscope. En utilisant un seul PM on peut décaler le niveau vertical du tiroir d'entrée (tiroir comparateur, type W) de façon à ce que, après l'amplification souhaitée, on ait toujours le haut du créneau sur l'écran de l'oscilloscope.

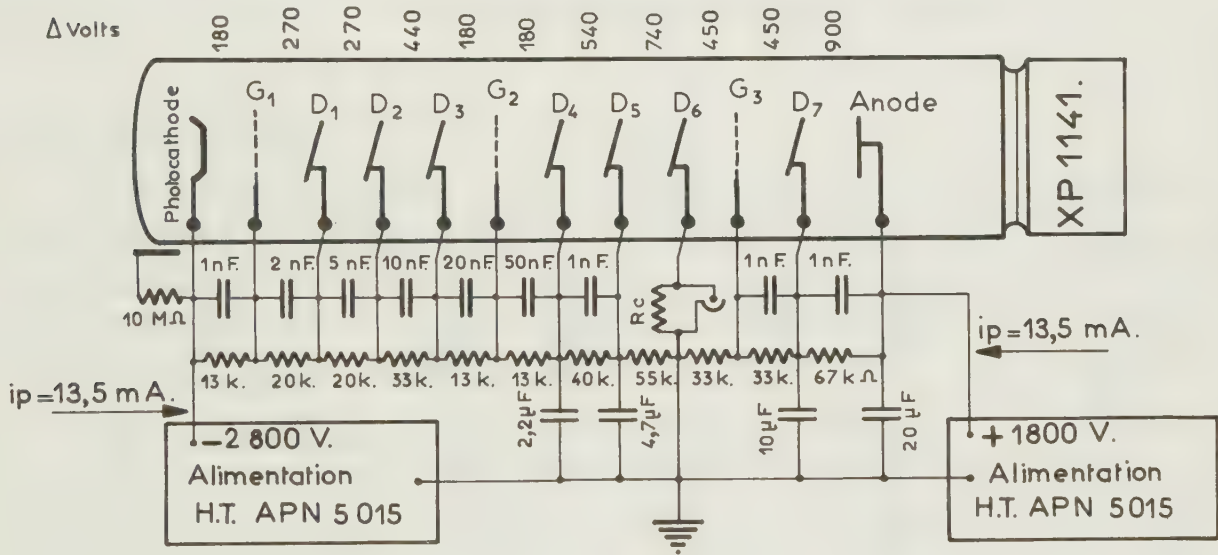
- Filtre électrique. Pour les mesures de temps de montée de variation de DO dans les temps courts (moins de 100 ns ; cf paragraphe C.5.3), nous avons utilisé le filtre représenté sur la figure 56. Le filtre passe-haut permet de mesurer le signal rapide sur l'oscilloscope Tektronix 585 (tiroir 86, 80 Mhz) ; nous avons calculé le facteur d'atténuation A du

filtre pour différentes fréquences F :

$$A = R_2 \left[(R_1 + R_2 + R_2 \frac{C_2}{C_1})^2 + (R_1 R_2 C_2 v - \frac{1}{C_1 v})^2 \right]^{1/2}$$

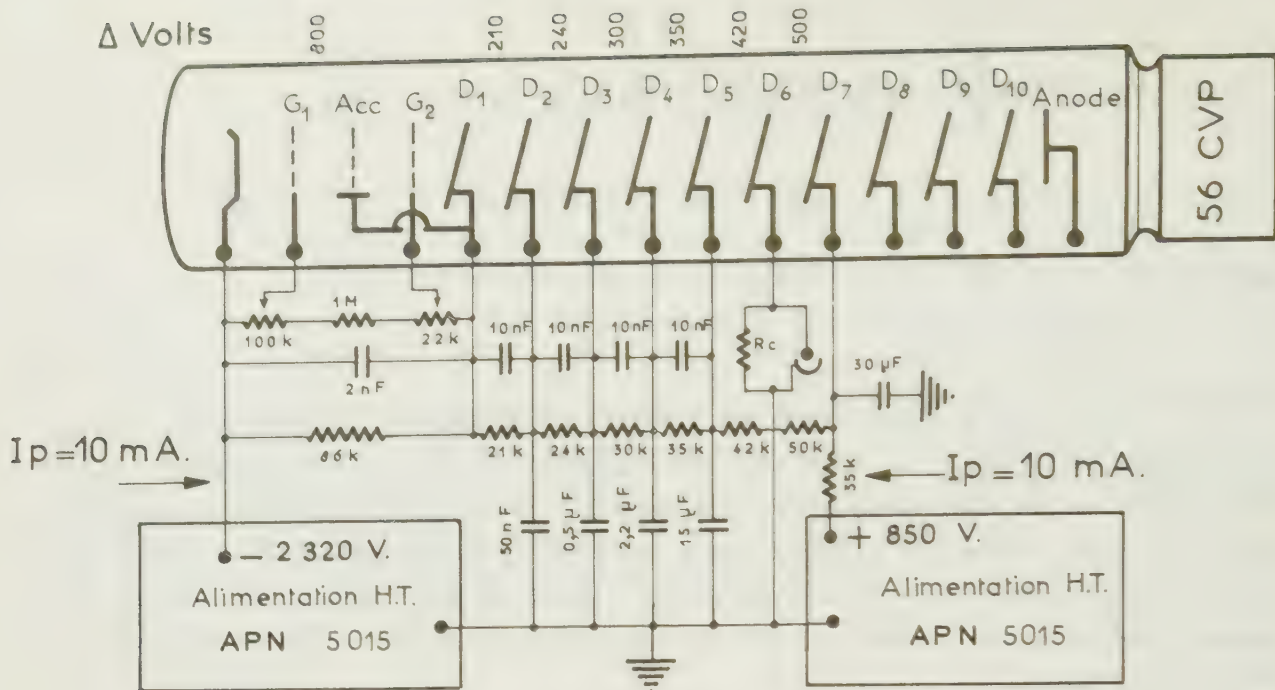
$v = 2 \pi F$	$R_1 = 100 \text{ ohms}$	$R_2 = 3000 \text{ ohms}$	$C_1 = 200 \text{ pF}$	$C_2 = 15 \text{ pF}$		
F_{Hz}	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
A	$3,75 \cdot 10^{-3}$	$3,75 \cdot 10^{-2}$	0,35	0,90	0,93	0,71

On voit que le signal rapide est affecté d'une atténuation connue et faible, tandis que le signal lent (tube éclair de 50 μ s, soit environ 10^4 Hz) est atténué fortement. Il peut être mesuré sur un autre oscilloscope (Tektronix 647) par l'intermédiaire d'une résistance de 10 000 ohms. On mesure en même temps l'énergie de l'impulsion laser, ce qui permet de connaître l'intensité de lumière d'analyse au moment où jaillit le laser (la fluctuation du temps de déclenchement de celui-ci est loin d'être négligeable par rapport à la durée de l'éclair analytique).



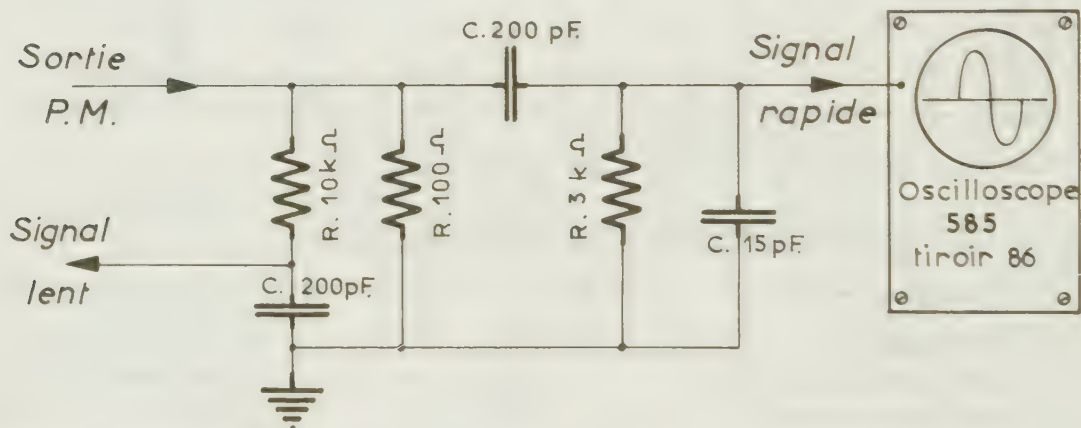
- Figure 54 -

Schéma de câblage du tube photomultiplicateur XP 1141. La sortie a été effectuée sur D₅, D₆ ou D₇. D : dynodes. G : autres électrodes.



- Figure 55 -

Schéma de câblage du tube photomultiplicateur 56 CVP



- Figure 56 -

Filtre utilisé pour observer les signaux rapides, $R_1 = 100 \Omega$ $R_2 = 3 \text{ k}\Omega$
 $C_1 = 200 \text{ pF}$ $C_2 = 15 \text{ pF}$

ANNEXE 2

INFLUENCE DE LA LUTEINE SUR LES AGREGATS OU LES DIMERES DE CHLOROPHYLLE

1 -

Dans les solvants apolaires (CCl_4 , hexane ...), la chlorophylle forme des dimères ou des agrégats plus ou moins bien définis [89] [106] [154]. Notre attention a été attirée sur les agrégats de Chl A dans les micelles de sigitonine par l'expérience suivante, qui était destinée à mesurer la diminution du peuplement de Chl A_T (par transfert) en présence de lutéine (cf. paragraphe C.3.2) :

Tableau I :

Variation du peuplement en Chl A_T (phase lente) et en ^3Lut (phase rapide) en fonction du rapport Lut/Chl A, pour une concentration identique en ChlA ($23 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) et pour un même rapport digitonine/ChlA ~ 6 . Excitation laser.

Rapport molaire Lut/Chl A	0	0,4	0,6	1,0
$\Delta\text{DO} \times 10^2$	} Chl A_T	0,8	1,1	1,9
534 nm				
	} ^3Lut	0	2,7	3,2
Rapport $\frac{\text{DO } 710 \text{ nm}}{\text{DO } 670 \text{ nm}} \times 10^2$	3,5	2,3	2,0	1,7

Ce dernier rapport est un indice de l'élargissement de la bande d'absorption de grande longueur d'onde de la chlorophylle. Les résultats précédents n'ont pas une signification quantitative très précise ; ils montrent toutefois que la présence de lutéine entraîne une augmentation du peuplement en Chl A_T . Ce point a été confirmé en mesurant la diminution de DO à 658 nm résultant de la formation de Chl A_T .

2 - Agrégation de la Chl A dans la digitonine

Nous avons d'abord étudié l'agrégation de la Chl A seule, dans la digitonine, en mesurant un certain nombre de paramètres, en fonction du rapport molaire digitonine/Chl A. La concentration en digitonine est constante et on varie la quantité de Chl A. Les paramètres choisis sont les suivants :

- Elargissement du pic d'absorption : $\frac{\text{DO } 700 \text{ nm}}{\text{DO } 670 \text{ nm}} \times 10$

- Rendement de fluorescence, mesuré en valeur relative au spectrofluorimètre Jobin-Yvon, type Béarn, par la hauteur du pic au maximum d'émission de la Chl A monomère (à 685 nm), sur des solutions de DO = 0,41 ajustée à 655 nm, longueur d'onde choisie pour l'excitation.

- Rendement du peuplement en état triplet, mesuré par l'augmentation de DO, à 481 nm, suivant l'excitation par un tube-éclair au xénon (40 J - 50 μs). La lumière excitatrice est filtrée par le système (Calflex + RG_2 3 mm Schott + filtre interférentiel

Balzers B 40 655 nm) ; DO de la cuve à 655 nm : 0,41. Cuve sous vide.

- Rendement de photooxydation mesuré par la diminution de DO, à 670 nm, de cuves éclairées pendant 10 min. sous air (longueur d'onde 655 nm : éclairage énergétique au niveau de la cuve $\sim 25 \text{ mW.cm}^{-2}$). DO initiale : 0,41 à 655 nm, ce qui correspond à DO = 1,1 à 670 nm pour la solution type monomère.

Les résultats sont consignés sur le tableau 2. Les chiffres obtenus pour le rendement de fluorescence et de formation de Chl A sont directement comparables et sont linéaires. Pour la photooxydation il ne s'agit que de valeurs indicatives.

Tableau 2 :

R = $\frac{\text{Digitonine}}{\text{Chlorophylle}}$	Elargissement du pic d'absorption	Fluorescence	Triplet $\frac{\Delta I}{I}$ % (481 nm)	Photooxydation (Δ DO 670)
7,3	0,84	7	0,03	0,11
14,6	0,61	24	0,10	0,155
29	0,51	164	0,35	0,21
58	0,33	906	1,44	0,45
364	0,10	2300	3,4	0,88

En première approximation ces résultats s'expliquent par un équilibre entre deux formes de chlorophylle (monomères et agrégats). Au sein de ces derniers, de plus en plus nombreux quand R diminue, l'énergie d'excitation est dissipée très rapidement en énergie vibrationnelle (cet aspect a été discuté par BOWERS et PORTER [13]). Par contre le monomère excité présente une fluorescence et une probabilité de passage à l'état triplet importantes. Les molécules à l'état triplet réagissent avec l'oxygène, d'où la photooxydation [102]. Toutefois ce schéma est insuffisant car la fluorescence varie plus vite que le peuplement en état triplet. Cette divergence peut s'expliquer par un mécanisme du type :

$(\text{Chl A} \text{ — } \text{Chl A})^* \longrightarrow \text{Chl A} + \text{Chl A}_T$, mécanisme qui a déjà été invoqué [156].

Ces conclusions sont confirmées par la mesure des spectres d'émission de fluorescence obtenus avec un spectrofluorimètre construit dans le Service. Appelons M (monomères) une solution avec R = 160 et A (agrégats) une solution avec R = 6. A température ordinaire, la solution M a un spectre d'émission présentant un pic principal à 679 nm, et un pic secondaire à 725 nm. La solution A a une très faible fluorescence, avec un maximum mal défini à 726 nm. Par contre à 77 K, si l'émission de M est peu modifiée, celle de A est considérablement renforcée et le pic est affiné : 735 nm (figure 57).

3 - Influence de la lutéine sur l'agrégation de la Chl A dans les micelles

Les expériences précédentes ont été reprises, à une valeur de R déterminée, en faisant varier la teneur en lutéine. Sur le plan quantitatif on observe des fluctuations importantes d'une préparation à l'autre. Les faits reproductibles sont les suivants :

- Le rendement de fluorescence de la chlorophylle A, à température ordinaire

augmente avec la teneur en lutéine. En effectuant ces mesures nous avons constaté que le pic de lumière diffusée (à 655 nm, ce pic est très bien séparé de l'émission de la chlorophylle par le spectrofluorimètre) augmente régulièrement avec la teneur en lutéine, ce qui indique une augmentation de la taille des particules en suspension. Il est possible que la lutéine, par ses deux hydroxyles, assure la liaison entre micelles pour former des micelles plus grosses.

- Le spectre d'absorption de la chlorophylle tend vers celui du monomère.

- Le spectre d'émission tend vers celui du monomère à température ordinaire ; à 77 °K on observe le même effet, perturbé par l'émission des agrégats restants (figure 57).

Par contre les variations sont moins nettes en ce qui concerne le peuplement en Chl A_T et le rendement de photooxydation. Cela provient peut-être de la compétition entre la formation de monomères (qui tend à augmenter ces effets) et le transfert $\text{Chl A}_T \longrightarrow {}^3\text{Lut}$ qui tend à les diminuer.

4 - Influence des xanthophylles sur la dimérisation de la chlorophylle dans des solvants apolaires.

Nous avons effectué ces expériences pour expliquer l'effet de la lutéine sur l'agrégation de la chlorophylle dans les micelles et tenter d'en tirer des indications sur le transfert d'énergie triplet. ARONOFF et KIRK [4] ont observé la désagrégation de la chlorophylle par des xanthophylles dans le CCl_4 alors que le carotène n'a pas d'effet. KATZ et coll [89] ont observé, en RMN, que le Mg de la chlorophylle pouvait être coordonné par un hydroxyle de la lutéine, en solution concentrée dans CCl_4 .

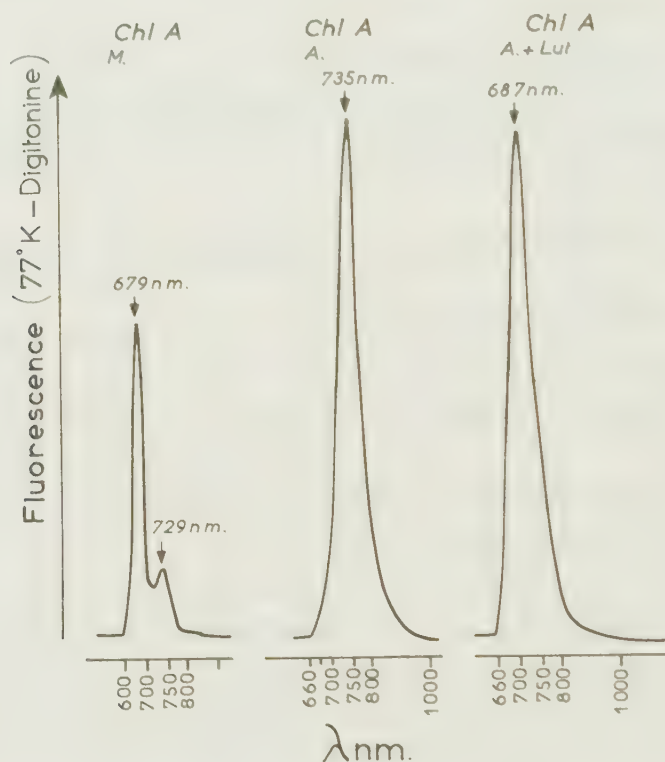
Nous avons fait un certain nombre d'expériences avec diverses xanthophylles (lutéine, isolutéine, violaxanthine, néoxanthine, canthaxanthine) et de la chlorophylle A dans l'hexane et dans le CCl_4 . Sans entrer dans les détails, disons que, à des rapports de concentration de l'ordre de 1 pour 1 entre Chl A et xanthophylles, ces derniers n'ont pas d'effet décelable sur les dimères de Chl A. La liaison $\text{Chl A} \cdots \text{Chl A}$ est donc nettement plus forte qu'une liaison $\text{Chl A} \cdots \text{xanthophylle}$. Si par contre le caroténoïde n'a pas été séché suffisamment on observe un effet très net de dissociation des dimères ; nous attribuons cet effet à des traces d'éthanol ou d'un autre corps polaire qui reste lié au caroténoïde.

Dans la préparation des micelles de digitonine la lutéine a été préalablement dissoute dans l'éthanol et elle n'a pas été particulièrement séchée par la suite. Il est donc possible que l'effet de désagrégation observé dans les micelles soit dû, au moins partiellement, à des traces d'éthanol. De légères différences entre préparations de micelles, pouvant entraîner des variations dans la quantité d'éthanol résiduelle, suffisent à rendre compte des irrégularités des résultats quantitatifs obtenus au sujet de l'effet de la lutéine.

La conclusion de ce travail n'est pas très affirmative en ce qui concerne l'effet de la lutéine sur l'agrégation de la Chl A dans les micelles et sur les conséquences qu'on peut en tirer sur le transfert d'énergie. En fait, le problème est très complexe, d'autant plus que les interactions entre Chl A semblent conduire, dans les micelles, à des agrégats mal définis et non à des dimères, qui, eux, sont bien caractérisés sur le plan spectroscopique.

Il ne s'agit pas non plus, bien que nous soyons en milieu aqueux, des agrégats observés dans différents solvants organiques en présence d'eau, car ces derniers ont un pic d'absorption caractéristique vers 740 nm [157].

Nous dirons simplement que la lutéine, dans les micelles de digitonine, entraîne la diminution de la quantité de chlorophylle sous forme d'agrégats, et que cet effet est prédominant sur un éventuel quenching de Chl A_T par la lutéine.



- Figure 57 -

Spectres d'émission de chlorophylle A dans des micelles de digitonine. La cellule d'une épaisseur de 2 mm, contient un mélange de glycérol 80 et d'une suspension de micelles dans un tampon phosphate 20. DO du mélange pour un trajet optique de 1 cm = 1,0 à 670 nm. Excitation à 440 nm. Température : 77 K. Entre les trois échantillons les intensités de fluorescence ne sont pas comparables. Les spectres ne sont pas corrigés.

Chl A (M) : R = digitonine/chlorophylle A = 160

Chl A (A) : R = 6

Chl A (A + Lut) : R = 6; lutéine/chlorophylle A = 0,5

Les spectres ont été effectués par M. Marc LUTZ

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AALBERSBERG W.I., HOIJTINK G.J., MACKOR E.L.,
WEIJLAND W.P.
J. Chem. Soc., 1959, 3049
- [2] AALBERSBERG W.I. mêmes auteurs que [1].
J. Chem. Soc., 1959, 3055
- [3] ABRAHAMSON E.W., ADAMS R.G., WULFF V.J.
J. Phys. Chem., 1959, 63, 441
- [4] ARONOFF S., KIRK P.
Nature, 1967, 213, 722
- [5] BACHMANN M.D., ROBERTSON D.S., BOWEN C.C.
ANDERSON I.C.
J. Ultrastructure Res. 1967, 21, 41
- [6] BAIRD N.C.
Communication au 3^e symposium de photochimie de
l'IUPAC. St MORITZ, 1970
- [7] BALL S., MORTON R.A.
Biochem. J., 1949, 45, 298
- [8] BELLIN J., RONAYNE M.
J. Chromato., 1966, 24, 131
- [9] BERGMANN K., O'KONSKI C.T.
J. Chem. Phys., 1962, 67, 2169
- [10] BIRKS J.B.
J. Luminescence, 1970, 1-2, 154
- [11] BOARDMAN N.K., THORNE S.W., ANDERSON J.M.
Proc. Nat. Ac. Sc. USA, 1966, 56, 586
- [12] BONNEAU R., FAURE J., JOUSSOT-DUBIEN J.
Ber. Bunsen., 1968, 72, 263
- [13] BOWERS P.G., PORTER G.
Proc. Royal Soc., A, 1967, 296, 435

- [14] BRETON J., MATHIS P.,
C.R. Acad. Sc. Paris, 1970, 271 D, 1094
- [15] BRIL C.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 66, 50
- [16] BROYDE S.B., BRODY S.S.
J. Chem. Phys., 1967, 46, 3334
- [17] BURNETT J.H.
in "Chemistry and Biochemistry of plant pigments"
(éd. par T.W. GOOWIN), p. 381. Academic Press,
Londres, 1965
- [18] BUSH W.V., ZECHMEISTER L.
J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2991
- [19] CHANCE B., DE VAULT D., LEGALLAIS V., MELA L.
YONETANI T.
in Nobel Symposium n° 5 "Fast reactions and primary processes
in chemical kinetics" (éd. par S. CLAESSON), p. 437. Almqvist.
Stockholm, 1967
- [20] CHAPMAN D., CHERRY R.J.
Nature, 1964, 203, 641
- [21] CHAPMAN D., CHERRY R.J., MORRISSON A.
Proc. Roy. Soc. A, 1967, 301, 173
- [22] CHERRY R.J.
Quarterly Rev., 1968, 22, 160
- [23] CHERRY R.J., CHAPMAN D.
Mol. Crystals, 1967, 3, 251
- [24] CHERRY R.J., CHAPMAN D., LANGELAAR J.
Trans. Farad. Soc., 1968, 64, 2304
- [25] CHESSIN M., LIVINGSTON R., TRUSCOTT T.G.
Trans. Farad. Soc., 1966, 62, 1519
- [26] CLAES H.
Biochem. Biophys. Res. Com., 1960, 3, 585
- [27] CLAES H., NAKAYAMA T.O.M.
Naturforschg, 1959, 14b, 746
- [28] CLAES H., NAKAYAMA T.O.M.
Nature, 1959, 183, 1053
- [29] CLAESSON S., LINDQVIST L., HOLMSTROM B.
Nature, 1959, 183, 661
- [30] CLAYTON R.K.
Molecular physics in photosynthesis
Blaisdell Pub. Co., New-York, 1965
- [31] COLLINS F.D.
Nature, 1950, 165, 817

- [32] COSTES C.
Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme
des caroténoïdes dans les feuilles.
Thèse, Paris, Orsay, 1964
- [33] DALLINGA G., MACKOR E.L., VERRIJN STUART A.A.
Mol. Phys., 1958, 1, 123
- [34] DANZIGER R.M., BAR-ELI K.H., WEISS K.
J. Phys. Chem., 1967, 2633, 71
- [35] DAVIDSON N., MARSHALL R., LARSH A.E., CARRINGTON T.
J. Chem. Phys., 1951, 19, 1311
- [36] DAVIES B.H.
in "Chemistry and biochemistry of plant pigments
(éd. par T.W. GOODWIN), p. 489 Academic Press, 1965
- [37] DE GROOTE R.,
C.R. Acad. Sc. Paris, 1966, 263 C, 1173
- [38] DEROCHE M.E., COSTES C.
in Progress in Photosynthesis Research
(éd. H. METZNER) Tubingen 1969, Vol. 2, 681
- [39] DINGLE J.T., LUCY J.A.
Biol. Rev., 1965, 40, 422
- [40] DUNKEN H., SCHMIDT D., PALM K.
Z. Chem., 1962, 2, 349
- [41] DURANTON J., GALMICHE J.M., ROUX E.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1958, 246, 992
- [42] DUYSSENS L.N.M.
Transfer of excitation energy in photosynthesis
Thèse. Utrecht., 1952
- [43] DUYSSENS L.N.M.
Progress in Biophysics, 1964, 14, 1
- [44] EBREY T.G.
J. Phys. Chem., 1967, 71, 1963
- [45] EMERSON R., ARNOLD W.
J. Gen. Physiol., 1932, 15, 391
- [46] EVANS D.F.
J. Chem. Soc., 1960, 1735
- [47] EVANS D.F.
J. Chem. Soc., 1961, 2566
- [48] FALUDI-DANIEL A., FRIDVALSZKY L., GYURJAN I.
Planta, 1968, 78, 184

- [49] FAURE J., BONNEAU R., JOUSSOT-DUBIEN J.
Photochem. Photobiol., 1967, 6, 331
- [50] FAURE J., JOUSSOT-DUBIEN J.
J. Chim. Phys, 1966, 63, 621
- [51] FISCHER H.
Z. Phys. Chem. NF, 1964, 43, 177
- [52] FOOTE C., Science, 1968, 162, 963
- [53] FOOTE C. cité par MATHEWS-ROTH M.M.,
KRINSKY N.I.
(ref. n° 122)
- [54] FOOTE C., DENNY R.W.
J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 6233
- [55] FORK D.C., AMESZ J.
Photochem. Photobiol., 1967, 6, 913
- [56] FRANCK J.
in "Handbuch der Pflanzenphysiologie", vol. 5/1, p.44
(éd. par W. RUHLAND), Springer, Berlin, 1960
- [57] FRENCH C.S.
in "Biochemistry of the chloroplasts" (éd. par T.W. GOODWIN)
vol. 1, p. 381. Academic Press. Londres, 1967
- [58] FUJIMORI J., LIVINGSTON R.
Nature, 1957, 180, 1036
- [59] FULLER R.C., ANDERSON I.C.
Nature, 1958, 181, 253
- [60] GIRAULT G., GALMICHE J.M., ROUX E.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1969, 269 D, 2265
- [61] GOEDHEER J.C.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 172, 252
- [62] GOLD V., HAWES B.W.V., TYE F.L.
J. Chem. Soc., 1952, 2167
- [63] GOODWIN T.W.
in Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Vol. 3
p. 272. Ed. par K. PAECH, M.V. TRACEY,
Springer Verlag. Berlin, 1955
- [64] GOVINDJEE, GOVINDJEE R.
Photochem. Photobiol., 1965, 4, 793
- [65] GRELLMANN K.H., MEMMING R., LIVINGSTON R.
J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 546
- [66] GRIFFITHS M., SISTROM W.R., COHEN-BAZIRE G., STANIER R.Y.
Nature, 1955, 176, 1211

- [67] GROSSWEINER L.I.
Photochem. Photobiol., 1969, 10, 183
- [68] HAGER A.
Planta, 1967, 74, 148
- [69] HASEGAWA K., MACMILLAN J.D., MAXWELL W.A., CHEICHESTER C.O.
Photochem. Photobiol., 1969, 9, 165
- [70] HATCHARD C.G., PARKER C.A.
Trans. Fara. Soc., 1961; 57, 1093
- [71] HAUSSER K.W., KUHN R., KUHN E.
Z. Phys. Chem., 1935, B29, 417
- [72] HEICKLEN J., COHEN N.
Advances in photochemistry, 1968, 5, 157
- [73] HERKSTROETER W.G., HAMMOND G.S.
J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 4769
- [74] HILDRETH W.W., AVRON M., CHANCE B.
Plant. Physiol., 1966, 41, 983
- [75] HIND G., JAGENDORF A.T.
Proc. Nat. Ac. Sc. USA, 1963, 49, 715
- [76] HOIJTINK G.J.
Mol. Phys., 1958, 1, 158
- [77] HOIJTINK G.J.
Chem. Weekblad, 1960, 56, 54
- [78] HOIJTINK G.J., Coll.
Inter. sur le calcul des fonctions d'onde.
CNRS Paris, 1958
- [79] HOIJTINK G.J.
Acc. Chem. Res., 1969, 2, 114
- [80] HOIJTINK G.J., VAN DER MEIJ P.H.
Physik. Chem. NF., 1959, 20, 1
- [81] HOIJTINK G.J., WEIJLAND W.P.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1957, 76, 836
- [82] HUBBARD R.
J. Gen. Phys., 1953, 37, 381
- [83] JAFFE H.H., ORCHIN M.,
Theory and applications of ultraviolet spectroscopy
John Wiley New-York, 1964
- [84] JOLIOT P., BARBIERI G., CHABAUD R.
Photochem. Photobiol., 1969, 10, 309

- [85] KAHN J.S., PURCELL A.E.
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112, 355
- [86] KANDLER O., SCHOTZ F.,
Z. Naturforschg, 1956, 11b, 708
- [87] KARRER P., JUCKER E.
Carotenoids, Elsevier, Amsterdam, 1950
- [88] KATO S., MORITA M., KOIZUMI M.
Bull. Chem. Soc. Jap., 1964, 37, 117
- [89] KATZ J.J.
Dev. Appl. Spec., 1968, 6, 201
- [90] KAWAOKA K., KHAN A.U., KEARNS D.R.
J. Chem. Phys., 1967, 46, 1842
- [91] KE B., TREHARNE R.W., McKIBBEN C.
Rev. Sc. Inst., 1964, 35, 296
- [92] KEARNS D.R., KHAN A.U.
Photochem. Photobiol., 1969, 10, 193
- [93] KEARNS D.R., HOLLINS R.A., KHAN A.U., CHAMBERS R.W.
RADLICK P.
J. Am. Chem. Soc., 1967, 89, 5455
- [94] KOIZUMI M., OBATA H., HAYASHI S.
Bull. Chem. Soc. Jap., 1964, 37, 108
- [95] KOK B., HOCH G.
in "Light and life" p. 397 (éd. par W.D. McELROY, B. GLASS
John Hopkins Univ. Press, Baltimore, 1961
- [96] KOSUI N., UCHIDA K., KOIZUMI M.
Bull. Chem. Soc. Jap., 1965, 38, 1958
- [97] KOWALLIK W.
Plant. Physiol., 1967, 42, 672
- [98] KRAMER H.E.A.
Z. Physik. Chem. NF, 1969, 66, 73
- [99] KRAMER H.E.A., HAFNER M., ZUGEL M.
Z. Physik. Chem. NF, 1969, 65, 276
- [100] KRAMER H.E.A., MAUTE A.
Ber. Bunsen., 1968, 72, 1092
- [101] KRASNOVSKII A.A.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 1960, 11, 363
- [102] KRASNOVSKII A.A., BYSTROVA M.I.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1968, 182, 211
- [103] KRINSKY N.I.
in "Photophysiology" éd. par A.GIESE, Vol. 3
1968, Vol. 3, p. 123, Academic Press, New-York

- [104] KUHN H.
J. Chem. Phys., 1949, 17, 1198
- [105] LAND E.J., SYKES A., TRUSCOTT T.G.
Chem. Comm., 1970, p. 332
- [106] LAVORAL J.
J. Phys. Chem., 1957, 61, 1600
- [107] LEWIS G.N., KASHA M.
J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 2100
- [108] LINDQVIST L.
Ark. Kemi, 1960, 16, 79
- [109] LINSCHITZ H., SARKANEN K.
J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 4826
- [110] LIVINGSTON R.
In "Actions biologiques et chimiques des radiations", coll.
dirigée par M. HAISSINSKY, édit. Masson, Paris, 1966, 9, 1
- [111] LIVINGSTON R., FUJIMORI E.
J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 5610
- [112] LIVINGSTON R., PUGH A.
Nature, 1960, 186, 969
- [113] LIVINGSTON R., WARE W.R.
J. Chem. Phys., 1963, 39, 2593
- [114] LIVINGSTON R.
in "Handbuch der Pflanzenphysiologie", vol. 5/1 p. 830
(éd. par W. RUHLAND), Springer, Berlin, 1960
- [115] LOWER S.K., EL SAYED M.A.
Chem. Rev., 1966, 66, 199
- [116] LUNDEGARDH H.
Nature, 1966, 212, 606
- [117] LUPINSKI J.H.
J. Phys. Chem. 1963, 67, 2725
- [118] LYALIN G.N., KOBYSHEV G.I., TERENIN A.N.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1963, 150, 407
- [119] McCARTIN P.J.
Trans. Farad. Soc., 1964, 60, 1694
- [120] McGLYNN S.P., AZUMI T., KINOSHITA M.
Molecular spectroscopy of the triplet state. Prentice-Hall,
Englewood Cliffs., 1969
- [121] MATHEWS-ROTH M., KRINSKY N.I.
Photochem. Photobiol., 1970, 11, 419
- [122] MATHEWS-ROTH M., KRINSKY N.I.
Photochem. Photobiol., 1970, 11, 555
- [123] MATHIS P.,
C.R. Acad. Sc. Paris, 1966, 263 D, 1770
- [124] MATHIS P.
Photochem. Photobiol., 1969, 9, 55

- [125] MATHIS P.
in "Progress in photosynthesis research",
1969, vol. 2, p.818. (éd. par H. METZNER), Tubingen
- [126] MATHIS P., GALMICHE J.M.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 264D, 1903
- [127] MAXWELL W.A., MACMILLAN J.D., CHICHESTER C.O.
Photochem. Photobiol., 1966, 5, 567
- [128] MEUNIER P.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1942, 215, 470
- [129] MICHEALIS L., GRANICK S.
J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 1212
- [130] MICHEALIS L., SCHUBERT M.P., GRANICK S.
J. Am. Chem. Soc., 1939, 61, 1981
- [131] MORAW R., WITT H.T.
Z. Physik. Chem. NF, 1961, 29, 1
- [132] NEMETHY G.
Angew. Chem. internat. Edt., 1967, 6, 195
- [133] NEMOTO M., KOKUBUN H., KOIZUMI M.
Bull. Chem. Soc. Jap., 1969, 42, 1223
- [134] NIKITIN A.A., TER SARKISTAN G.S.,
MIKHAILEV B.M., MIRCHENKOVA L.E.
Opt. Spectr., 1959, 6, 226
- [135] NORRISH R., PORTER G.
Nature, 1949, 164, 658
- [136] PARK R.B., BIGGINS J.
Science, 1964, 144, 1009
- [137] PARKER C.A., JOYCE T.
Photochem. Photobiol., 1967, 6, 395
- [138] PETRACEK F.J., ZECHMEISTER L.
J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3188
- [139] PLATT J.R.
in "Radiation biology", Vol. 3 p. 71 (éd. par A.HOLLAENDER)
Mc Graw-Hill, 1956, New-York
- [140] PLATT J.R.
J. Chem. Phys., 1956, 25, 80
- [141] PLATT J.R.
Science, 1959, 129, 372
- [142] PORTER G., WRIGHT M.R.
Disc. Farad. Soc. Energy transfer with special reference
to biological systems, 1959, p. 18
- [143] PULLMAN B., PULLMAN A.
Quantum chemistry, Interscience, 1963, New York
- [144] RABINOWITCH E., EPSTEIN L.P.
J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 69

- [145] RAPKINE L., STRUYK A.P., WURMSER R.
J. Chim. Phys., 1929, 26, 340
- [145] bis ROBERTSON D.S., BACHMANN M., ANDERSON I.C.
Photochem. Photobiol., 1966, 5, 797
- [146] ROBINSON G.W.
Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 1963, 49, 521
- [147] ROBINSON G.W.
Ann. Rev. Phys. Chem., 1964, 15, 311
- [148] ROBINSON G.W.
in "Energy conversion by the photosynthetic apparatus"
Brookhaven symposium, 1966, 19, p. 16
- [149] ROSENBERG B.
J. Chem. Phys., 1958, 29, 1108
- [150] ROSENBERG B.
Symposium on electrical conductivity in organic solids
(éd. par H. KALLMANN et M. SILVER)
p. 291, Interscience, 1961, New York
- [151] ROUX E., DURANTON J., GALMICHE J.M.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1955, 241, 1618
- [152] SALEM L.
The Molecular Orbital Theory of conjugated systems
Benjamin, 1966, New York
- [153] SAUER K., CALVIN M.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 64, 324
- [154] SAUER K., LINDSAY-SMITH J.R., SCHULTZ A.J.
J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 2681
- [155] SCHNURIGER B., BOURDON J.
Photochem. Photobiol., 1968, 8, 361
- [156] SEELY G.R.
in "The chlorophylls" (éd. par L.P. VERNON, G.R. SEELY)
p. 523, Academic Press, New York, 1966
- [157] SHERMAN G., WANG S.F.
Nature, 1966, 212, 588
- [158] SIEBRAND W.
in "The triplet state" (éd. par A.B. ZAHLAN)
p.31. The university press. Cambridge, 1967
- [159] SMITH E.L., PICKELS E.G.
Proc. Nat. Ac. Sc. USA, 1940, 26, 272
- [160] SPIKES J.D.
in "Photophysiology", éd. par A. GIESE,
vol. 3, p. 33. Academic Press, New York, 1968
- [161] SYKES A., TRUSCOTT T.G.
Chem. Comm. 1969, p. 274
- [162] TEALE F.W.J.
Nature, 1958, 181, 415

- [163] TEALE F.W.J., WEBER G.
Biochem. J., 1957, 66, 8p
- [164] THORNBUR J.P., STEWART J.C., HATTON M.W.C.
BAILEY J.L.
Biochemistry, 1967, 6, 2006
- [165] TONZ O.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, 349, 1483
- [166] TRIC C.
Thèse, Paris-Orsay, 1969
- [167] TRIC C., LEJEUNE V.
Photochem. Photobiol., sous presse
- [168] USUI Y.
Bull. Chem. Soc. Jap., 1969, 42, 1231
- [169] VERNON L.P., KATOH S., SAN PIETRO A., SHAW E.R.
in "Energy conversion by the photosynthetic apparatus"
Brookhaven symposium, 1966, n° 19, p. 102
- [170] VERNON L.P., KE B., MOLLENHAUER H.H., SHAW E.R.
in "Progress in photosynthesis research" (éd. par H. METZNER)
1968, vol. 1 p. 137
- [171] WAGNER P.J., HAMMOND G.S.
in "Advances in photochemistry", 1968, 5, 21
- [172] WALD G., JURKOWITZ L., LOEB J.N.
Nature, 1959, 184, 614
- [173] WALLCAVE L., ZECHMEISTER L.
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4495
- [174] WARBURG O.
Biochem. Z., 1919, 100, 230
- [175] WASSERMAN A.
Chem. J., 1954, 4329
- [176] WASSERMAN A.
Trans. Farad. Soc., 1957, 53, 1029
- [177] WASSERMAN A.
Chem. J., 1959, 979
- [178] WASSERMAN A.
Mol. Phys., 1959, 2, 226
- [179] WAYNE R.P.
in "Advances in photochemistry" (éd. par J.N. PITTS,
G.S. HAMMOND, W.A. NOYES), 1969, vol. 7, p. 311,
Interscience, New York
- [180] WEISSMAN S.I., DE BOER E, CONRADI J.J.
J. Chem. Phys., 1957, 25, 963
- [181] WITT H.T.
Naturwissenschaften, 1955, 42, 72

- [182] WITT H.T.
in Nobel symposium n° 5 "Fast reactions and primary
processes in chemical kinetics" (éd. par S. CLAEISSON)
1967, p. 81 et 261, Almqvist. Stockholm
- [183] WITT H.T., MORAW R., MULLER A.
Z. Physik. Chem. NF, 1959, 20, 193
- [184] WOLF F.T., STEVENS M.V.
Photochem. Photobiol., 1967, 6, 597
- [185] WOLFF C., WITT H.T.
Z. Naturforschg, 1969, 24 b, 1031
- [186] WOLKEN J.J.
"Euglena". Appleton-Century-Crofts,
1967, New-York
- [187] YAMAMOTO H.Y., NAKAYAMA T.O.M., CHICHESTER C.O.
Arch. Biochem. Biophys., 1962, 97, 108
- [188] YAMASHITA K., KONISHI K., ITOH M., SHIBATA K.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 172, 511
- [189] ZECHMEISTER L.
"Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A
and arylpolyenes"
Springer Verlag. Vienne, 1962
- [190] ZIEGLER G., WITT H.T.
Z. Phys. Chem. NF, 1961, 28, 273
- [191] ZIEGLER G., MULLER A., WITT H.T.
Z. Phys. Chem. , 1961, 29, 13
- [192] ZSCHEILE F.P., COMAR C.L.
Bot. Gaz., 1941, 102, 463

Vu et approuvé

Orsay, le 8 octobre 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences
d'Orsay

G. POITOU

